



Photo-et biodégradation de dérivés du benzothiazole : étude en système combiné

Andrei Bunesu

► To cite this version:

Andrei Bunesu. Photo-et biodégradation de dérivés du benzothiazole : étude en système combiné. Chimie analytique. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2006. Français. NNT : 2006CLF21725 . tel-00713567

HAL Id: tel-00713567

<https://theses.hal.science/tel-00713567>

Submitted on 2 Jul 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Numéro d'Ordre : D. U. 1725

UNIVERSITE BLAISE PASCAL

(U. F. R. Sciences et Technologies)

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES FONDAMENTALES

N° : 522

THESE EN COTUTELLE

Avec l'Université d'Etat de Moldavie à Chisinau

Présentée pour obtenir le titre de

DOCTEUR D'UNIVERSITE

(Spécialité : Chimie Organique Biologique)

Par

Andrei BUNESCU

Diplômé de Master

PHOTO- ET BIODEGRADATION DE DERIVES DU BENZOTHAZOLE : ETUDE EN SYSTEME COMBINE

Soutenue publiquement le 21 décembre 2006, devant la commission d'examen.

Président et rapporteur	M. Christophe FERRARI (Pr)	Laboratoire de Glaciologie et Géophysique de l'Environnement, Grenoble, France
Rapporteur:	Mme Angela CINCILEI (Dr)	Institut de Microbiologie, Académie de Sciences de Moldavie, Chişinau, Moldavie
Examineurs:	Mme Olga COVALEOVA (Dr)	Université d'Etat de Moldavie, Faculté de Chimie et Chimie Technologique, Chişinau, Moldavie
	Mme Anne-Marie DELORT (DR)	Laboratoire Synthèse Et Etude de Systèmes à Intérêt Biologique, Aubière, France
	M. Iacob GUȚU (Pr)	Université d'Etat de Moldavie, Faculté de Chimie et Chimie Technologique, Chişinau, Moldavie
	M. Gilles MAILHOT (DR)	Laboratoire de Photochimie Moléculaire et Macromoléculaire, Aubière, France
Membres invités:	Mme Pascale BESSE-HOGGAN (Dr)	Laboratoire Synthèse Et Etude de Systèmes à Intérêt Biologique, Aubière, France
	Mme Michèle BOLTE (DR)	Laboratoire de Photochimie Moléculaire et Macromoléculaire, Aubière, France

A mes parents,

Pour leur aide aux cours du temps, pour leur encouragement, pour leur compréhension.

Aucune

Dédicace ne saura vous exprimer la profondeur de mes sentiments.

Je vous aime très fort.

A mon frère Aurel.

A ma fiancée Doinița,

Pour sa fidélité.

A mes copains,

Iulia, Sașa, Sandu, Luminița, Dima, Igor, Victor

Merci à

Stéphanie, Marlène, Ahmatjan, Radouane, Pierre, Maria Matulova et Dominiaue Palka, Mounir, Samir, Nicolas, Elisabeth, Charlène, Carlos, Emmanuelle, Ecaterina, Hana, Rosa, Pascal, Florence, Sylvain, Marius, Anne-Sophie, Mathieu, Franck, Fabrice ...et je m'excuse pour les gens que les ai oublié et que je ne les ai pas cités.

Pour leurs amitiés et leurs sympathies.

REMERCIEMENTS

Le travail qui a fait l'objet de ce mémoire a été effectué dans le Laboratoire de Photochimie Moléculaire et Macromoléculaire UMR CNRS 6505 (LPMM) et le Laboratoire des Systèmes à Intérêts Biologiques UMR 6504 (SEESIB) de l'Université Blaise Pascal dirigés par Madame Claire RICHARD, Directeur de Recherche au CNRS et Monsieur Jean BOLTE, Professeur à l'Université Blaise Pascal. Je tiens sincèrement à les remercier pour la confiance qu'ils m'ont accordée en m'accueillant aux laboratoires.

Il m'est particulièrement agréable d'exprimer ma gratitude et ma reconnaissance à Madame Anne-Marie DELORT, Directeur de Recherche au CNRS, à Monsieur Gilles MAILHOT, Directeur de Recherche au CNRS et à Monsieur Iacob GUȚU, Professeur à l'Université d'Etat de Moldavie qui ont assuré la responsabilité scientifique de cette thèse. Je suis reconnaissant pour leur attitude personnelle ouverte, amabilités et amitiés. Leur disponibilité tout au long de ces années de recherche, leur attention inlassable, leur soutien moral et leur enthousiasme de chercheur ont instauré une ambiance propice au travail. Qu'ils soient assurés de ma profonde gratitude.

Mes remerciements vont également à Madame Angela CINCILEI, Chercheur à l'Institut de Microbiologie de l'Académie des Sciences de Moldavie (Chisinau) et à Monsieur Christophe FERARI, Professeur à l'Université Joseph Fourier au Laboratoire de Glaciologie et de Géophysique de l'Environnement, d'avoir accepté d'examiner ce mémoire et d'en être les rapporteurs auprès de l'Université.

Je suis très reconnaissant envers Madame Michèle BOLTE, Directeur de Recherche CNRS au LPMM et à Madame Olga COVALIOVA, enseignante à l'Université d'Etat de Moldavie (Chisinau), d'avoir bien voulu faire partie de ce jury de thèse.

Je remercie très chaleureusement Madame Pascale BESSE-HOGGAN, Chargé de Recherche CNRS et Madame Martine SANCELME, Ingénieur de recherche à l'Université Blaise Pascal (SEESIB) pour m'avoir guidé pour les expériences de microbiologies, donné des conseils avisés ainsi que pour leur disponibilité.

Monsieur Bruno COMBOURIEU, Maître de conférences à l'Université Blaise Pascal de Clermont-Ferrand et Monsieur Ion DRAGALIN, Senior Chercheur à l'Institut de Chimie, Académie des Sciences de Moldavie, pour leur aide précieuse.

Je souhaiterais remercier vivement Madame Bernadette LAVEDRINE, Technicienne à l'Université Blaise Pascal, pour l'aide bienveillante et Monsieur Guillaume VOYARD, Assistant Ingénieur au CNRS, pour sa disponibilité au Laboratoire de Photochimie.

Enfin, je voudrais remercier l'ambassade de France et l'alliance Française en Moldavie de m'avait fait confiance pour mener ce projet en finançant ma thèse, spécialement Monsieur Oliver JACQUOT.

D'autre part l'INTAs et l'OTAN qui ont participé au financement de projet.

SOMMAIRE

I INTRODUCTION	1
II ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	5
II.1 LA FAMILLE DES BENZOTHIAZOLES	6
II.1.1 Structure et utilisation des benzothiazoles	6
II.1.2 Devenir des benzothiazoles dans l'environnement	8
II.1.3 Toxicité des benzothiazoles	12
II.2 PHOTO- ET BIODEGRADATION DES BENZOTHIAZOLES	13
II.2.1 Photodégradation des benzothiazoles	13
II.2.2 Biodégradation des benzothiazoles	18
II.2.2.1 Biodégradation par des boues activées ou des cultures mixtes	18
II.2.2.2 Biodégradation dans les sols	21
II.2.2.3 Biodégradation par des cultures pures.....	23
II.2.3 Processus combiné de photo- et biodégradation	32
II.3 RÔLE DU FER EN TANT QUE PHOTOINDUCTEUR ET DANS LES PROCESSUS ENZYMATIQUES LORS DE LA DEGRADATION DE POLLUANTS.....	35
II.3.1 Le Fer dans l'environnement	35
II.3.1.1 Le fer dans les eaux naturelles	35
II.3.1.2 Les transformations du fer en solution aqueuse	36
II.3.1.3 Les espèces de fer(III) en solution aqueuse.....	39
II.3.1.4 Caractérisation des complexes aqueux de fer(III) par spectrophotométrie.....	43
II.3.1.5 Comportement des complexes aqueux de fer(III) sous excitation lumineuse.....	44
II.3.1.6 Les rendements quantiques de formation de $\cdot\text{OH}$ et fer(II).....	46
II.3.2 Rôle du fer comme photoinducteur de la dégradation de polluants	50
II.3.3 Rôle du fer dans les processus enzymatiques de biodégradation : monooxygénases et dioxygénases	55
II.3.3.1 Les monooxygénases	57
II.3.3.2 Les dioxygénases	63
II.3.3.3 Effet du fer sur la biodégradation de composés xénobiotiques	71
II.4 LES COMPLEXES DE FER (APCAs) ET PLUS PARTICULIÈREMENT LE FENTA : PROCESSUS PHOTOCHIMIQUES ET METABOLISATION PAR LES MICROORGANISMES	74
II.4.1 Les agents complexants	74
II.4.2 Photodégradation des complexes de fer-APCAs	77
II.4.3 Métabolisation des complexes de fer par des microorganismes	83
II.4.3.1 Souches microbiennes pures dégradant les APCAs	83
II.4.3.2 Voies métaboliques impliquées dans la dégradation des APCAs.....	84
II.4.3.3 Influence de la spéciation des complexes sur la métabolisation des APCAs	87
II.4.4 Dégradation des APCAs : processus abiotiques vs processus biotiques	88
II.4.5 Photodégradation de composés organiques induite par des complexes APCAs de fer(III) en solution aqueuse	90
III OBJECTIFS	97
IV MATERIEL ET METHODES	99
IV.1 REACTIFS ET SOLVANTS.....	100
IV.2 PREPARATION DES SOLUTIONS	101
IV.2.1 Solutions des xénobiotiques pour l'incubation	101
IV.2.2 Solution du complexe FeNTA	101
IV.2.3 Solutions pour les dosages	102
IV.3 REACTEUR.....	102
IV.4 CONDITIONS DE CULTURE	103
IV.5 CONDITIONS DE PHOTO ET DE BIODEGRADATION	104
IV.5.1 Dégradation des xénobiotiques photoinduite par des sels ferriques ou FeNTA	104
IV.5.2 Dégradation des xénobiotiques par <i>Rhodococcus rhodochrous</i> (OBT18)	104
IV.5.2.1 Méthode générale	104
IV.5.2.2 Cas des cellules en absence de fer	105
IV.5.2.3 Cas de cellules en présence de sels ferriques ou de FeNTA	105
IV.5.3 Incubation de <i>Rhodococcus rhodochrous</i> (OBT18) en présence d'ABT et de FeNTA – Mise en évidence des différents métabolites	106
IV.6 METHODES D'ANALYSE.....	107

IV.6.1 Méthodes spectroscopiques	107
IV.6.1.1 Spectroscopie d'absorption UV-visible	107
IV.6.1.2 Spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire	107
IV.6.2 Méthodes chromatographiques	109
IV.6.2.1 Chromatographie Liquide Haute Performance	109
III.6.2.2 Chromatographie Liquide Haute Performance couplée à la Spectrométrie de Masse (LC-MS)	110
IV.6.3 Méthodes de dosages	111
IV.6.3.1 Dosage du Fe(II)	111
IV.6.3.2 Dosage du fer total	112
IV.6.3.3. Dosages du carbone organique total dissous (TOC)	114
IV.6.4 Analyse de la distribution du fer dans les différents compartiments intra et extra-cellulaires	116
IV.7 SYNTHÈSES DU 6OH-ABT ET 4OH-ABT	117
IV.7.1 Synthèse du 6OH-ABT	117
IV.7.2 Synthèse du 4OH-ABT	118
V RESULTATS ET DISCUSSION	119
V.1 PHOTO- ET BIODÉGRADATION DE L'ABT EN MILIEU AQUEUX	120
V.1.1 Caractéristiques physico-chimiques de l'ABT	120
V.1.2 Photo- et biodégradation de l'ABT : étude des processus séparés	121
V.1.3 Photo- et biodégradation d'ABT : étude des processus combinés	126
V.1.3.1 Cinétiques d'évolution d'ABT dans les différentes conditions expérimentales	126
V.1.3.2 Influence de la concentration en FeNTA sur les processus de biodégradation d'ABT	133
V.1.4 Identification des photoproduits et métabolites	136
V.1.4.1 Identification du métabolite 2 (M2)	141
V.1.4.2 Identification du métabolite 3 (M3)	143
V.1.5 Photo et biodégradation du 6OH-ABT (produit de dégradation majoritaire de ABT) : systèmes simples et combinés	145
V.1.5.1 Caractéristiques physico-chimiques du 6OH-ABT	145
V.1.5.2 Photodégradation du 6OH-ABT : étude des systèmes simples	146
V.1.5.3 Photo et biodégradation du 6OH-ABT : systèmes simples et combinés	148
V.1.7 Impact du fer sur le métabolisme cellulaire	150
V.1.7.1 Devenir du FeNTA lors des processus de photodégradation	150
V.1.7.2 Devenir du FeNTA lors du processus de photo-biodégradation	153
V.1.7.3 Suivi du fer lors des processus de photo-biodégradation	157
V.1.7.3.1. Dosage du fer total en solution aqueuse	157
V.1.7.3.2 Dosage du fer dans les différents compartiments cellulaires	159
V.1.7.4 Biodégradation d'ABT avec des cellules cultivées en présence de fer (FeNTA)	161
V.1.8 Discussion	162
V.1.8.1 Evaluation de l'efficacité des systèmes	162
V.1.8.2 Comparaison des voies de dégradation photochimique et microbiologique	164
V.1.8.3 Pourquoi l'activation par le fer ?	167
V.2 PHOTO- ET BIODÉGRADATION DE BT EN MILIEU AQUEUX	169
V.2.1 Caractéristiques physico-chimiques de BT	169
V.2.2 Photodégradation de BT en présence de sel ferrique	170
V.2.3 Biodégradation de BT en présence de sels de fer (III)	174
V.2.3.1 Effet de la concentration des sels ferriques	174
V.2.3.2 Effet du pH	176
V.2.4 Biodégradation de BT en présence du ligand NTA	177
V.2.5 Discussion	178
V.2.5.1 Evaluation de l'efficacité des systèmes	178
V.2.5.2 Comparaison des voies de dégradation photochimique et microbiologique	179
V.2.5.3 Rôle du fer	180
VI CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	182
VI.1 CONCLUSIONS	183
VI.2 PERSPECTIVES	185
VII RÉFÉRENCES	186

LISTE DES ABREVIATIONS

3-CP	3-Chlorophénol
3FC	3-Fluorocatéchol
4-CP	4-Chlorophénol
4MeO-ABT	2-Amino-4-méthoxybenzothiazole
6OH-MBT	6-hydroxy-2-mercaptobenzothiazole
6OH-MBTU	6-Hydroxyméthabenzthiazuron
ABT	2-Aminobenzothiazole
AOP's	Processus d'oxydation avancée
APCAs	Acides amino-polycarboxyliques
ASDA	Acide asparaginique
B12O	Benzoate-1,2-dioxygénase
BADH	Benzyl alcool déshydrogénase
BT	Benzothiazole
BTSO ₃ (BTSA)	Acide 2-benzothiazolylsulfonique
C23O	Catéchol-2,3-dioxygénase
CDTA	Acide cyclohexanediaminotétraacétique
CE ₅₀	Concentration efficace, d'un polluant qui cause un effet toxique donné chez 50 % des individus exposés après un temps d'exposition normalisé.
Conc.	Concentration
CT	Tétrachlorure de carbone
DAD	Diode Array Detector
DBP	Dibutylphthalate
DH	Déshydrogénase
diOBT	2,6-dihydroxybenzothiazole
DL ₅₀	Dose létale, de substance causant la mort de 50% d'une population animale donnée (souvent des souris ou des rats) dans des conditions d'expérimentation précises.
DMP	2,6-Diméthylphénol
DTPA	Acide diéthylènetriaminepentaacétique
ED3A	Acide éthylènediaminetriacétique
EDDA	Acide éthylènediaminediacétique
EDDHA	Acide éthylènediaminedi(o-hydroxyphenyl)acétique
EDDS	Acide éthylènediaminedisuccinique

EDMA	Acide éthylènediaminemonoacétique
EDTA	Acide éthylènediaminetétraacétique
EDTMP	Acide éthylènediamino(tétraméthylène)phosphonique
ESI	Electrospray ionisation
FAD	Flavine adénine dinucléotide
FMN	Flavine mononucléotide
HEDTA	Acide hydroxyéthylènediaminetriacétique
HLB	Hydrophilic lyophylic bond
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMSH	2-Hydroxymuconic semialdéhyde hydrolase
HPLC	Chromatographie Liquide à Haute Performance
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
IC	Carbone inorganique
IDA	Acide iminodiacétique
IR	Spectrométrie Infrarouge
LC-MS	Chromatographie liquide avec détecteur de masse
LC-MS-MS	Chromatographie liquidée couplée avec un détecteur de masse en tandem
LMCT	Transfert de Charge du Ligand vers le Métal
MBT	2-Mercaptobenzothiazole
MBTS	2,2'-(dithiobis)benzothiazole
MBTU	Méthabenzthiazuron
MO	Monooxygénase
MS	Spectrométrie de masse
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NTA	Acide nitrilotriacétique
NtrR	Nitrate réductase
OBT	2-Hydroxybenzothiazole
RCSB	Research Collaboratory for Structural Bioinformatics
RMN ¹ H	Résonance Magnétique Nucléaire du proton
RPE	Resonance Paramagnétique Electronique
rpm	Rotation per minute
SD	Déviation standard

SDA	Acide serinediacétique
SPE	Solid Phase Extraction
TC	Carbone Total
TCMTB	2-(thiocyanométhylthio)benzothiazole
TMO	Toluene monooxygénase
TOC	Carbone Organique Total
TSPd ₄	Triméthylsilylpropionate de sodium tétradeutééré
UV	Ultraviolet
β-ADA	Acide β-alaninediacétique

I

INTRODUCTION

Je commencerai mon introduction par définir ce qu'est la pollution des eaux : « Un milieu aquatique est dit pollué lorsque son équilibre a été modifié de façon durable par l'apport en quantités trop importantes soit de substances plus ou moins toxiques, d'origine naturelle ou issues d'activités humaines, soit encore d'eaux trop chaudes ».

Les cours d'eau ont été de tout temps le réceptacle des eaux usées et de déchets en tout genre. Les pollutions les plus anciennes sont celles dues aux matières fécales et organiques. Puis une certaine salinisation des eaux continentales due au lessivage des déchets miniers est apparue, suivie au tournant du XX^e siècle par un début de pollution métallique liée au développement industriel. Mais avec l'augmentation de la population, l'urbanisation croissante, l'industrialisation, et l'intensification de l'agriculture, les usages de l'eau se sont multipliés et sa consommation a connu un formidable accroissement. Ce développement s'est accompagné d'une inévitable augmentation des rejets ménagers, agricoles et industriels : au fil du temps, les taux de pollution des milieux aquatiques se sont accrus et de nouveaux types de pollution sont apparus telles les pollutions radioactives et thermiques.

Dans les pays industrialisés, la pollution des cours d'eau a pris une ampleur nouvelle et inquiétante durant la seconde moitié du XX^e siècle. A partir des années 1950, l'utilisation d'engrais a fait apparaître une pollution particulière, l'eutrophisation, due à des apports excessifs de nutriments dans les milieux aquatiques. Mais cette dégradation constante de la qualité des eaux continentales et, simultanément, la difficulté grandissante à traiter ces eaux pour les rendre potables ont progressivement fait évoluer les consciences. Des mesures de protection ont commencé à être prises. Depuis quelques années, le développement de plus en plus généralisé de l'assainissement des eaux usées et des effluents industriels tend à progressivement limiter certains dommages causés aux écosystèmes aquatiques.

La volonté légitime de développement des pays pauvres s'est en revanche rarement accompagnée d'un souci de protection de l'environnement et des hommes, souvent par manque de moyens techniques et financiers. Leur situation est donc aujourd'hui le plus souvent dramatique car les pollutions sont très importantes et les infrastructures de traitement des eaux d'alimentation ou de dépollution des eaux usées le plus souvent inexistantes. La république de Moldavie se trouve aujourd'hui dans cette situation préoccupante pour le pays et pour l'environnement. Le travail de thèse présenté ici s'insère d'ailleurs dans deux programmes internationaux (OTAN et INTAS) dont les objectifs sont clairement d'aider au développement de solutions adaptées à ce pays.

Actuellement des recherches sont menées par de nombreux groupes afin de trouver des processus efficaces et peu coûteux pour traiter les eaux contaminées, par exemple en utilisant les microorganismes et la lumière solaire. L'objectif à long terme de notre travail de recherche s'inscrit complètement dans cette démarche. En effet, il s'agit de mettre au point un procédé de dépollution combinant la biodégradation et la photodégradation (directe ou induite).

Cette thèse constitue la première étape d'un programme de recherches visant à atteindre cet objectif. Elle permettra de tester la faisabilité de notre projet et de rechercher les meilleures conditions pour combiner ces deux processus de dégradation. Le travail a commencé par l'étude de dérivés de la famille des benzothiazoles car nous possédions des souches bactériennes bien identifiées (du genre *Rhodococcus*) pour leur biodégradation et une bonne connaissance des voies de biodégradation. D'un point de vue photochimique, le travail a été orienté vers l'utilisation de sels ferriques qui sont connus pour être de bons photoinducteurs pour la dégradation de polluants organiques présents dans l'eau. Les benzothiazoles sont de bons modèles d'étude car ils sont utilisés dans de nombreuses applications industrielles, sont peu dégradables, toxiques et retrouvés aussi bien dans les compartiments aquatiques de l'environnement que dans les effluents de stations d'épuration urbaines.

Dans une première étape, les cinétiques et les mécanismes de dégradation du polluant en solution aqueuse par les deux processus, microbiologique et photochimique, ont été étudiés séparément. Une attention particulière a été portée à l'identification des différents produits de dégradation.

Dans une deuxième étape, le procédé combiné des deux processus de dégradation a été mis en place et nous nous sommes attachés à comprendre les mécanismes mis en jeu. Nous avons particulièrement étudié le rôle du fer dans la biodégradation des benzothiazoles par les *Rhodocoques*.

Cette étude a été menée sur deux composés, le benzothiazole (BT) et le 2-aminobenzothiazole (ABT) qui sont respectivement fortement et faiblement biodégradables par les souches de *Rhodococcus*.

Dans une première partie, une étude bibliographique de la famille des benzothiazoles, de leur photodégradation et biodégradation est présentée. Une description des différentes formes de fer présentes dans le compartiment aquatique et de leurs propriétés photochimiques est également détaillée. La fin du chapitre est consacrée au rôle du fer dans les processus

enzymatiques de biodégradation et à la présentation des acides amino-polycarboxyliques (APCAs) qui sont de forts agents complexant du fer. La biodégradation de ces complexes et leur impact photochimique dans l'environnement aquatique sont également présentés.

La deuxième partie décrit en détail le matériel et les méthodes scientifiques utilisés pendant cette thèse.

La troisième partie présente l'ensemble des résultats expérimentaux obtenus.

Enfin, une dernière partie interprète et discute l'ensemble des résultats.

II

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

II.1 LA FAMILLE DES BENZOTHAIAZOLES

II.1.1 Structure et utilisation des benzothiazoles

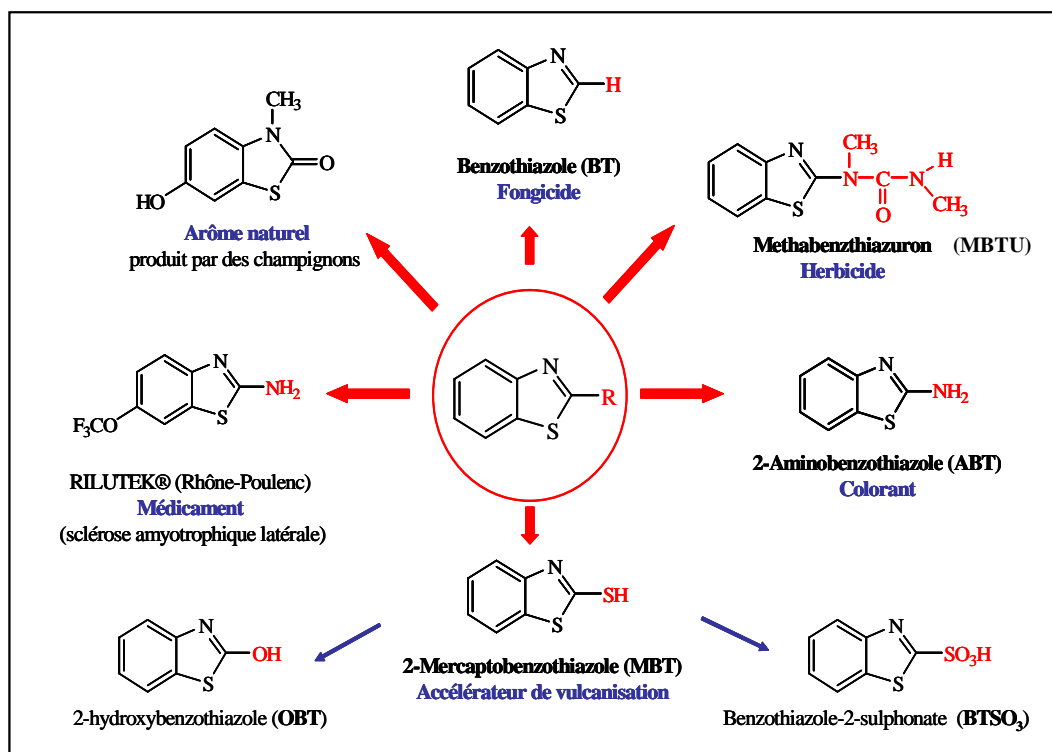


Figure II.1 : Structure de quelques benzothiazoles.

La **Figure II.1** présente la structure de quelques benzothiazoles, qui est constituée d'un cycle benzénique accolé à un cycle thiazole. Ces composés sont rarement des produits naturels : on peut citer le cas d'un arôme produit par des champignons. Par contre, ils sont synthétisés à grande échelle au niveau industriel, pour des applications variées. Ainsi selon la nature du substituant R en position 2 du cycle thiazole, ils peuvent être utilisés :

- comme **fongicide/bactéricide** : le benzothiazole (BT) est utilisé comme fongicide tout comme le 2-(thiocyanométhylthio)benzothiazole (TCMTB) qui entre dans la composition du fongicide Busan® (Brownlee *et al.*, 1992). Ce dernier est également utilisé pour protéger le bois des attaques fongiques (Fiehn *et al.*, 1994).
- comme **pesticide/herbicide** : le méthabenzthiazuron (MBTU) est utilisé comme herbicide sur les cultures de blé tendre d'hiver et de pois protéagineux. Il constitue la matière active des deux formulations commerciales Tribunil® et Ormet®. Il présente un spectre d'activités étendu sur graminées et dicotylédones mais il est peu efficace sur les plantes vivaces.
- dans la **préparation de colorants** : 2-aminobenzothiazole (ABT) (Gaja et Knapp, 1997).

- **dans la pharmacologie :** le Riluzole commercialisé par Rhône-Poulenc (Rilutek®) pour traiter la sclérose amyotrophique latérale (Bryson *et al.*, 1996), ou le 2-(4-aminophényl)benzothiazole étudié pour ses propriétés antitumorales (Dubey *et al.*, 2006). D'autres dérivés ont été testés comme inhibiteurs de topoisomérase II (Choi *et al.*, 2006) ou agents anti-malaria (Hout *et al.*, 2004), certains composés montrant une activité proche de celle des composés références.
- **comme agents de vulcanisation :** cependant, la principale utilisation des benzothiazoles concerne la fabrication de gommés, en particulier de pneumatiques où ils agissent en tant qu'accélérateurs de vulcanisation. Le 2-mercaptobenzothiazole (MBT) est un des agents employés dans la fabrication du caoutchouc. Il est notamment utilisé dans la fabrication d'autres accélérateurs de vulcanisation tel que le 2,2'-(dithiobis)benzothiazole (MBTS). Ces deux composés catalysent la formation de ponts disulfure (réticulation) entre des polymères élastomères insaturés, permettant l'obtention d'un matériau flexible et élastique (procédés Goodyear, Hancock, Parkes, Peachy) (*Figure II.2*).

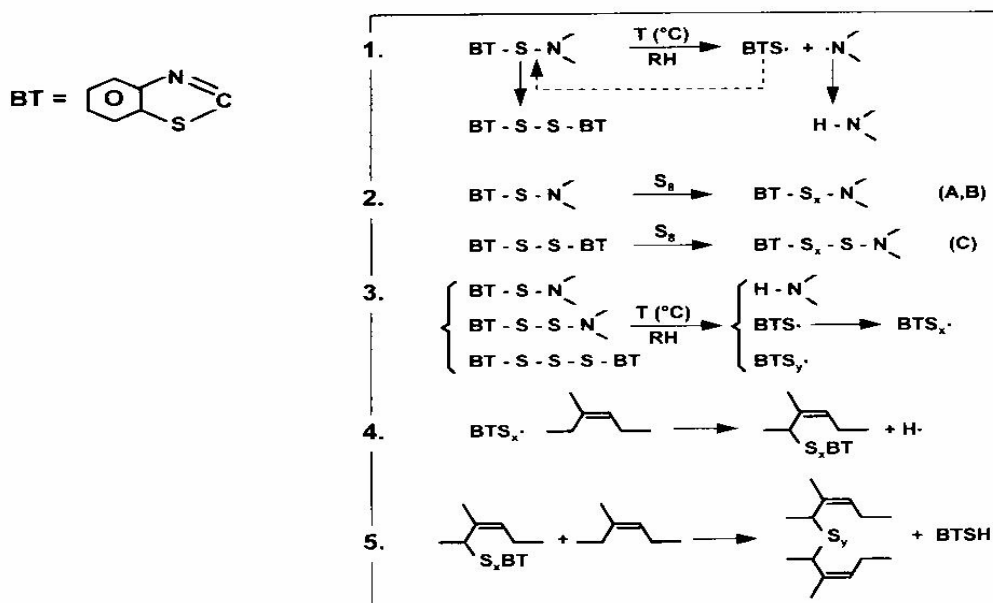


Figure II.2 : Mécanisme de la vulcanisation (d'après Janin, 1999).

La vulcanisation permet en effet l'association du latex du caoutchouc avec les atomes de soufre, afin de réduire sa sensibilité aux variations de température et à l'action oxydante de l'air (Janin, 1999). Dans ce procédé, le MBTS agit comme réactif tandis que le MBT est retrouvé comme produit secondaire de la réaction.

Le MBT entre également dans la composition de liquides de refroidissement comme inhibiteurs de corrosion (Brownlee *et al.*, 1992).

L'acide 2-benzothiazolylsulfonique (BTSO_3), le benzothiazole (BT) et le 2-hydroxybenzothiazole (OBT) sont des sous-produits de synthèse du MBT.

II.1.2 Devenir des benzothiazoles dans l'environnement

Nous possédons assez peu de données sur les quantités de benzothiazoles produits chaque année qui peuvent se retrouver dans l'environnement (eaux de surface, eaux souterraines) ou encore dans les stations d'épuration des villes. Quelques chiffres concernent les dérivés de benzothiazoles utilisés dans la fabrication des gommages et particulièrement des pneus (type MBT). Ainsi dans les années 1980, la production totale de tels dérivés en Europe de l'Ouest était estimée à 38 000 tonnes (Kloepfer *et al.*, 2005). En 1985, la production de MBT était de 25 000 tonnes aux Etats-Unis et l'Agence de Protection de l'Environnement Américaine (www.epa.gov) estimait que près de 500 tonnes étaient relarguées dans la nature (Gaja et Knapp, 1998).

L'origine des dérivés de benzothiazole retrouvés dans l'environnement ou dans les stations de traitement des eaux est variée. En dehors des usines de production, le lessivage de produits manufacturés peut être une source de contamination indirecte. Ainsi par exemple, des études ont montré que le MBT n'est pas étroitement lié dans la matrice de caoutchouc et peut donc être entraîné par lessivage. C'est ainsi que ce composé a été retrouvé dans du sérum humain ou des préparations médicamenteuses, la fuite provenant dans ce cas du plastique des seringues ou des bouchons. Le MBT peut être également relargué dans l'environnement *via* les stocks de vieux pneus et des voies à grande circulation. Après 5 étapes de lessivage réalisées sur des pneus, il a été montré que près de 50 % de la quantité initiale de MBT est entraînée (De Wever *et al.*, 2001). Comme l'ont montré plus récemment Kloepfer *et al.* (2005), une autre source non négligeable provient des eaux usées domestiques, sans que l'on sache de quels types de produits les benzothiazoles sont excrétés. Peu d'études ont permis une évaluation quantitative des benzothiazoles dans les eaux, car les techniques analytiques de dosage sont assez complexes. Seules les techniques récentes de LC-MS mises au point par l'équipe de Reemstma (2000) ont permis d'analyser les principaux dérivés de benzothiazole dans des stations d'épuration, des eaux de surface, des eaux usées domestiques et des eaux de lessivage de voies de circulation. Nous présenterons ici les résultats principaux de leurs études.

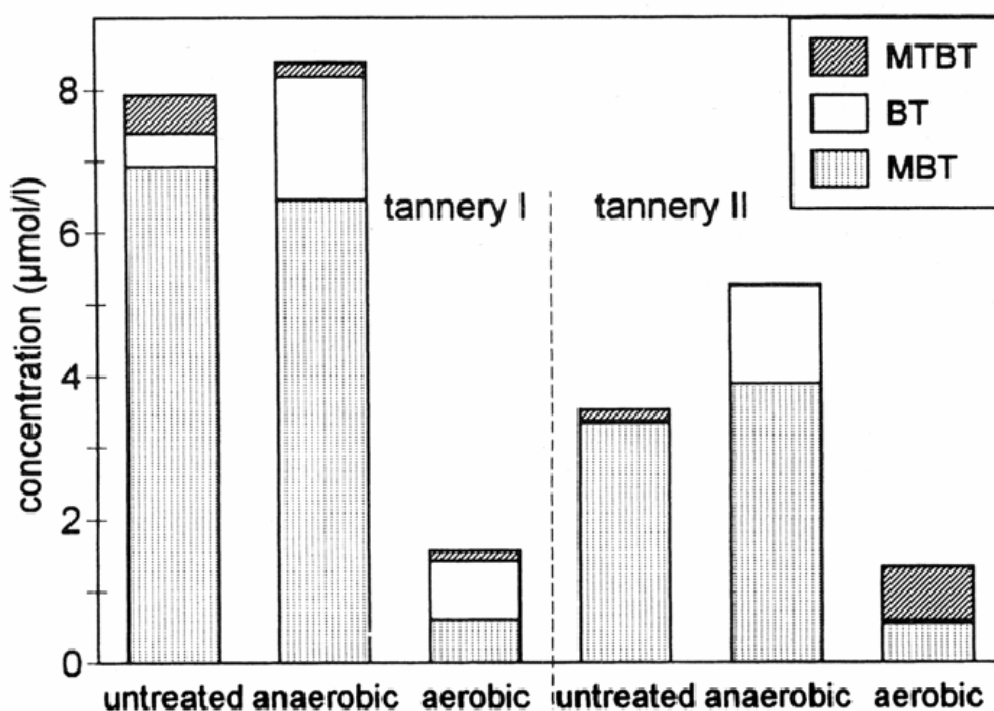


Figure II.3 : Concentrations moyennes en benzothiazoles dosés dans des effluents de tanneries avant et après passage dans des stations pilotes de traitement des eaux (nombre d'échantillons analysés. Tannerie I $n = 8$; Tannerie II, $n = 6$; période totale d'observation, 13 semaines)(d'après Reemstma *et al.*, 1995).

La **Figure II.3** présente les concentrations moyennes de MBT, BT et MTBT (2-(méthylthio)benzothiazole, $R = SCH_3$) dosées dans les effluents de deux tanneries (I et II) et dans deux stations pilotes de traitement des eaux (aérobie et anaérobie) de ces mêmes tanneries (Reemstma *et al.*, 1995). En fait, ces trois dérivés du benzothiazole proviennent de la transformation du TCMTB ((2-thiocyanométhylthio)benzothiazole, $R = SCH_2SCN$) utilisé comme fongicide dans le traitement des peaux. En milieu anaérobie, le MBT est peu transformé, le MTBT diminue mais le BT augmente. En condition aérobie, la concentration totale des composés semble fortement diminuer, mais les auteurs ont montré qu'en fait, il s'agit d'une forte adsorption des benzothiazoles sur les floccs microbiens. Ces résultats montrent que ces composés sont assez peu dégradés lors du traitement biologique et peuvent donc se retrouver dans les eaux de surface.

L'étude suivante concerne la station d'épuration municipale de Berlin-Ruhleben, où trois systèmes sont comparés : un système avec des boues activées (CAS pour Conventional Activated Sludge) et deux systèmes utilisant des bioréacteurs à membrane (MBR pour Membrane Reactive Bioreactors), MBR1 fonctionne avec une pré-dénitrification, MBR2 avec

une post dénitrification) (Kloepfer *et al.*, 2004). Les concentrations en ABT, BT, MTBT, BTSA ($R = SO_3$), MBT et OBT dans ces trois systèmes d'épuration ainsi que dans l'eau à traiter sont reportées dans le *Tableau II.1*.

	Influent		CAS		MBR 1		MBR 2	
Concentration [$ng\ L^{-1}$]	Conc	SD	Conc	SD	Conc	SD	Conc	SD
ABT	27	15	17	5	25	6	15	5
BT	852	197	550	190	286	68	232	85
MTBT	162	61	440	95	284	67	510	180
BTSA	1704	752	2100	484	1517	401	1332	258
MBT	191	71	20	29	21	8	7	7
OHBT	501	156	140	79	45	23	75	101
Sum [nM]	19.8	4.8	17.4	2.9	11.3	2.2	11.3	2.1
DOC [$mg\ L^{-1}$]	58.1	12.7	14.0	2.2	11.9	1.6	11.8	1.4
Molar elimination [%]								
Sum of benzothiazoles			12		43		43	
DOC			76		80		80	

Tableau II.1 : Concentrations moyennes et déviations standards (SD) de divers benzothiazoles dans trois systèmes d'épuration ainsi que dans l'eau à traiter (moyenne de 20 échantillons collectés durant 24 h pendant 3 mois). CAS pour Conventional Activated Sludge; MBR pour Membrane Reactive Bioreactors. (d'après Kloepfer *et al.*, 2004).

Ces résultats montrent que la somme totale des dérivés du benzothiazole dans l'eau usée à traiter est de $3,4\ \mu g\ L^{-1}$ soit $0,02\ \mu M$ (donc environ 100 fois moins que dans l'eau de tannerie). Les produits les plus concentrés sont le BT et le BTSA alors que le MBT et l'ABT sont en concentration faible. Là encore les différents systèmes d'épuration biologique sont globalement peu efficaces malgré de grosses disparités selon les dérivés étudiés. Dans le cas des boues activées, la somme totale des benzothiazoles reste presque inchangée avant et après traitement. Le MBT est éliminé à environ 90 %, le OBT à 70% (mais ces deux produits sont minoritaires) mais le BT est éliminé seulement à 40%. De plus, la concentration de certains composés augmente comme le BTSA (20%) et le MTBT (160%). Ce dernier composé est formé à partir d'une méthylation du MBT. Les bioréacteurs à membrane sont un peu plus efficaces que les boues conventionnelles : on passe alors à 40% d'élimination de la somme totale des composés.

Une dernière étude menée dans plusieurs stations d'épuration urbaines de Berlin et de Pékin confirme les résultats précédents (Kloepfer *et al.*, 2005). La somme des benzothiazoles mesurés dans les eaux à traiter va de $1,9$ à $6,5\ \mu g\ L^{-1}$; là encore le BTSA est le composé le plus concentré (35 à 70% du total), viennent ensuite le BT, l'OBT et le MTBT. Le MBT et

l'ABT sont très faiblement représentés. Le suivi de ces stations pendant plusieurs semaines indique que la baisse totale des benzothiazoles n'excède pas 2 à 5 %. Comme précédemment, le BTSA et le MTBT ne sont pas éliminés et sont même produits. Les auteurs ont ensuite mesuré le devenir des effluents d'une des stations de Berlin qui sont rejetés dans un canal (19 km) rejoignant le lac Tegel. La **Figure II.4** donne les résultats de ces mesures, on peut voir que la concentration de ces benzothiazoles reste relativement stable dans les eaux de surface.

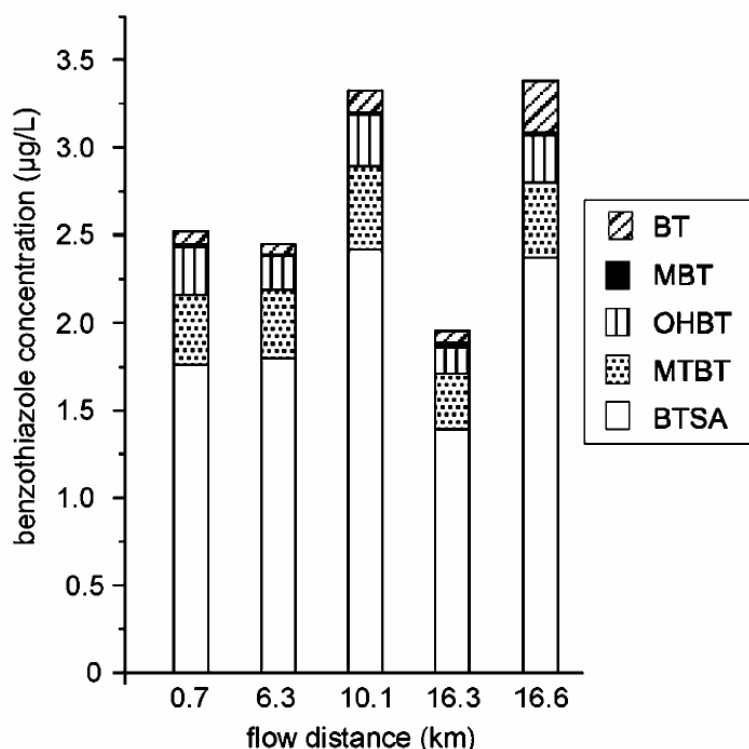


Figure II.4 : Concentrations de chaque benzothiazole ($\mu\text{g L}^{-1}$) le long du canal Blankenfelder graben/Nordgraben recueillant les effluents d'une des stations d'épuration de Berlin. Durée de l'observation 15 h. (d'après Kloepper et al., 2005).

D'autres études ont permis de déterminer l'importance relative des sources de benzothiazoles arrivant dans les stations d'épuration urbaines. Ainsi l'eau d'écoulement des routes contient une quantité importante de benzothiazoles, qui peut atteindre $74 \mu\text{g L}^{-1}$, soit plus de dix fois la concentration retrouvée dans les stations d'épuration. Dans ce cas, les benzothiazoles majoritaires sont le BTSA (60% du total), le OHBT (25-30%) et le BT (8-13%), le MBT et MTBT étant négligeables bien que le MBT soit l'agent de vulcanisation des pneus. Enfin le résultat le plus surprenant est la concentration très importante de benzothiazoles mesurée dans les eaux usées domestiques. En effet, elle représente de 50 à 80% du total des quantités de benzothiazoles retrouvées dans les stations d'épurations urbaines. L'origine de ces produits reste inconnue.

En conclusion, ces études montrent que certains benzothiazoles sont très récalcitrants et que les traitements subis en station d'épuration sont peu efficaces pour les éliminer. Les dosages effectués dans les eaux de surface montrent aussi qu'ils sont peu sensibles aux facteurs abiotiques tels que la lumière solaire. Afin d'apprécier l'impact du rejet de ces substances dans l'environnement, des études ont été menées pour évaluer leur toxicité.

II.1.3 Toxicité des benzothiazoles

La plupart des composés de la famille des benzothiazoles, et notamment le MBT, présente des propriétés nocives, voire même toxiques. Ce composé présente ainsi une activité biocide sur les microorganismes du sol aux concentrations trouvées dans la formulation normale des gommes (De Wever, 1995), une activité antivirale (Rada *et al.*, 1979) ou encore des propriétés anti-Candida et antifongiques (Bujdakova *et al.*, 1993). De Wever *et al.* (1997a) ont réalisé une étude approfondie de l'impact des benzothiazoles, en particulier du MBT sur les bactéries. Ils ont montré que le MBT était effectivement le plus toxique des composés étudiés. Bactériostatique hydrophobe, le MBT semble pouvoir s'accumuler dans les membranes cellulaires et détériorer leur intégrité, en particulier leur perméabilité. Il semble que la fonction thiol soit responsable de la toxicité de ce composé (De Wever *et al.*, 1994a ; De Wever, 1995).

Pour l'homme, le MBT présente des effets allergènes qui rendent sa présence dans les gants en caoutchouc responsable de dermatoses sévères. Le MBT est d'ailleurs répertorié en tant qu'allergène dermatologique (Adams et Warshaw, 2006). Sa DL_{50} chez le rat est évaluée à $3,8 \text{ mg kg}^{-1}$. D'autres études ont montré une activité cancérogène et mutagène chez le rat et la souris (Gold *et al.*, 1993). Une étude grandeur nature a révélé que les travailleurs exposés au MBT avaient un risque augmenté de mort par cancer de la vessie (Whittaker *et al.*, 2004).

Une autre étude menée dans notre laboratoire en collaboration avec le Laboratoire de Biologie des Protistes de l'Université Blaise Pascal de Clermont-Ferrand a permis d'évaluer l'écotoxicité de certains benzothiazoles ainsi que celle de leur dérivé hydroxylé en 6 sur le cycle benzénique en utilisant un micro-biotest, Microtox[®]. Nous verrons dans la suite de ce chapitre que ces composés correspondent à des métabolites obtenus avec différentes souches pures de microorganismes.

Le test Microtox[®] est un test normalisé d'évaluation de la toxicité aiguë sur la bactérie marine, *Vibrio fischeri*, qui émet en conditions normales de la lumière bleu-vert. Il s'agit alors de déterminer la concentration (CE₅₀) en toxique qui entraîne une inhibition de 50% de la luminescence naturelle de cette bactérie. Le **Tableau II.2** présente les valeurs moyennes de CE₅₀ obtenues pour les différents xénobiotiques et leurs produits de biodégradation après 30 min d'exposition au toxique. Les composés les plus toxiques pour ce test sont le BT et le MBT. Il faut noter aussi que les dérivés hydroxylés (métabolites) sont toujours moins toxiques que les molécules parents.

Benzothiazoles	CE ₅₀ (mg L ⁻¹)	σ
Benzothiazole (BT)	0,364	0,028
2-hydroxybenzothiazole (OBT)	1,801	0,005
2,6-dihydroxybenzothiazole (diOBT)	6,382	0,465
2-mercaptobenzothiazole (MBT)	0,212	0,018
2-mercapto-6-hydroxybenzothiazole (6OH-MBT)	1,318	0,133
2-aminobenzothiazole (ABT)	6,347	0,713
2-amino-6-hydroxybenzothiazole (6OH-ABT)	16,017	1,442
Méthabenzthiazuron (MBTU)	22,665	2,385
6-hydroxyméthabenzthiazuron (6OH-MBTU)	132,335	12,546
Acide 2-benzothiazolsulfonique (BTSO ₃)	294,870	58,260

Tableau II.2: Résultats du test Microtox[®] pour différents benzothiazoles après un temps d'exposition au toxique de 30 min ainsi que les écarts types (σ) correspondants ($U = NCH_3CONHCH_3$) (d'après Malouki, 2004).

Ainsi, le rejet de benzothiazoles dans les compartiments aquatiques est susceptible de nuire au fonctionnement des écosystèmes, de poser un problème majeur d'environnement et de santé publique. Des équipes de recherche se sont alors intéressées à l'étude de la biodégradation de ces composés par des microorganismes capables de croître sur ce type de polluant.

II.2 PHOTO- ET BIODEGRADATION DES BENZOTHIAZOLES

II.2.1 Photodégradation des benzothiazoles

La photochimie de cette classe de composés a débuté par des études réalisées par photolyse directe en solution organique et se dirige actuellement vers l'utilisation des procédés d'oxydation avancée.

Párkányi et Abdelhamid (1985) ont étudié la photolyse directe du 2-mercaptobenzothiazole (MBT), visant en premier lieu l'identification des produits intermédiaires formés ou ceux considérés comme produits terminaux stables. Le MBT a été

irradié dans des réacteurs en pyrex en présence d'oxygène. Quand le benzène ou le toluène sont utilisés comme solvant de réaction, les auteurs ont observé que le produit principalement formé était le bis-(2-benzothiazolyl)disulfure, alors que la bis-(2-benzothiazolyl)disulfone correspondante a été obtenue intermédiairement, le BTSO₃ étant le produit final de la réaction dans des solutions d'acétonitrile, de méthanol ou d'éthanol (**Figure II.5**). La présence d'oxygène est indispensable pour que la réaction puisse avoir lieu, alors que l'eau résiduelle serait nécessaire pour les étapes ultérieures de la séquence réactionnelle.

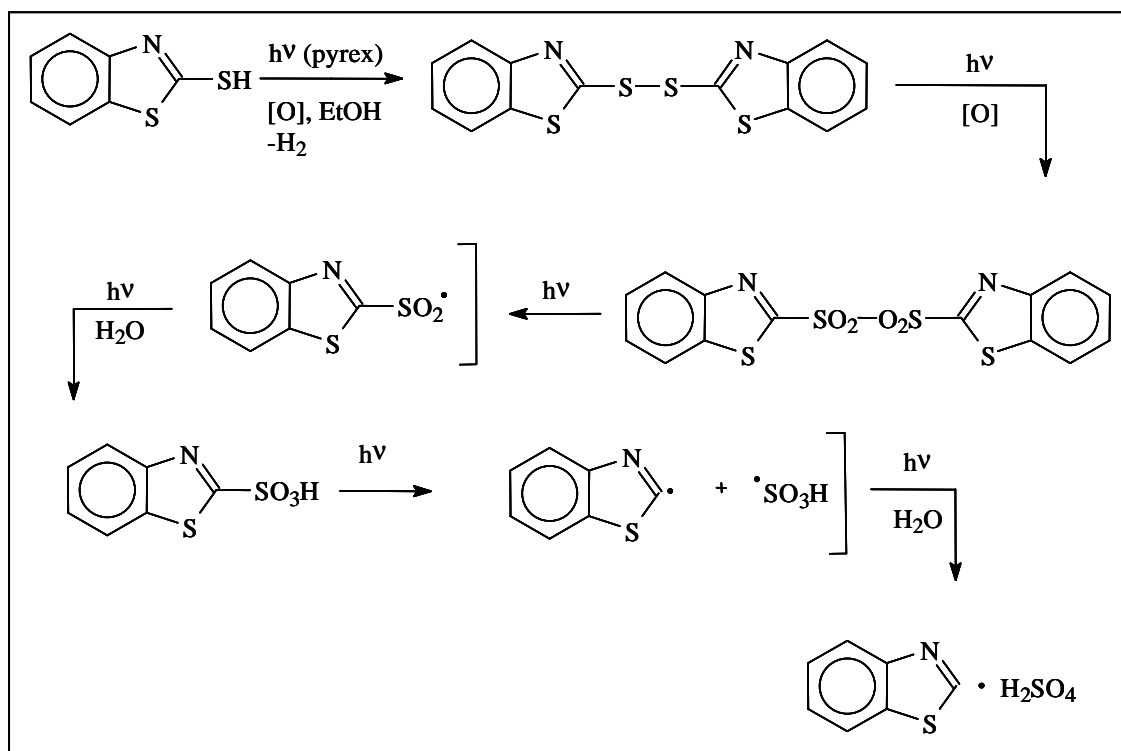


Figure II.5: Mécanisme de photolyse directe du 2-mercaptobenzothiazole (MBT) en milieu organique (d'après Párkányi et Abdelhamid, 1985).

Brownlee *et al.* (1992) ont conduit une étude complète concernant le devenir dans le compartiment aquatique du 2-(thiocyanométhylthio)benzothiazole (TCMTB) et de benzothiazoles apparentés (le TCMTB est le principe actif du fongicide BUSAN®). En présence de lumière, le TCMTB subit une photolyse directe rapide (Temps de demie-vie inférieur à 1 jour) produisant du MBT ($\eta = 0,5$) et des traces de BT. MBT est également photolysable et donne à son tour trois photoproduits : le BT (28-47%), l'OBT (4-5%) et des traces d'un autre produit non identifié, les pourcentages de formation de ces différents composés variant avec la quantité de matière organique dissoute dans l'eau. Les rendements quantiques de transformation solaire du TCMTB et du MBT sont estimés à 0,01 et 0,002 respectivement. A l'issue de leur étude, les auteurs ont proposé une voie de dégradation du

TCMTB dans l'environnement (**Figure II.6**), mettant en évidence la formation de produits de dégradation stables : BT et OBT.

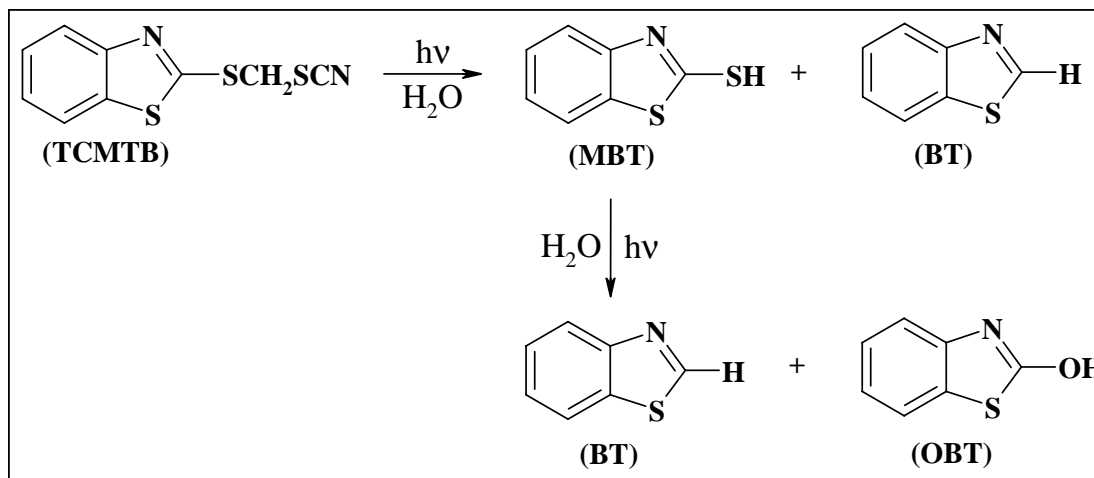


Figure II.6 : Photolyse du TCMTB (d'après Brownlee et al., 1992).

Plus récemment, Malouki et al. (2004) ont étudié la photolyse à 313 nm du MBT dans l'eau. Le MBT est apparu plus photoréactif que la plupart des benzothiazoles. En effet, sa forme anionique ($pK_a = 6,94 \pm 0,05$) qui est 10 fois plus réactive que la forme moléculaire a un rendement quantique de disparition $\Phi_{313nm} = 0,02$. Cette phototransformation après un mécanisme de désulfurisation conduit à la formation de BT et de OBT. De plus, les auteurs ont comparé la phototransformation du MBT en solution dans de l'eau milli-Q et dans une eau de lac. Dans ce dernier cas, ils ont montré que la disparition du MBT était 4 fois plus rapide montrant ainsi que des chromophores présents dans l'eau du lac pouvaient contribuer de manière importante à la phototransformation du MBT dans l'environnement aquatique.

Pour essayer d'éliminer efficacement les benzothiazoles, différents procédés d'oxydation avancée (O_3 , H_2O_2 , ...) ont été testés.

Fiehn et al. (1998) ont étudié l'ozonolyse du MBT dans l'eau pure ou dans des eaux usées issues de tanneries. Le MBT montre une forte affinité pour l'ozone et plusieurs produits de dégradation sont formés, les trois composés majoritaires étant le BT, le benzothiazole-2-sulfite et dans une moindre mesure, l'OBT. Ces composés sont à leur tour dégradés, et peuvent même être minéralisés avec une ozonation plus poussée. Les mêmes résultats sont obtenus sur les eaux de tannerie mais avec des temps d'ozonation nécessaires pour la minéralisation beaucoup plus longs. Le processus d'ozonation se révèle donc très efficace. Valdés et Zaror (2005) ont récemment amélioré le procédé en combinant l'oxydation par l'ozone avec la présence de charbon activé. Ils ont ainsi obtenu une forte accélération du

processus de dégradation de BT. Ils ont montré, grâce à l'utilisation de pièges à radicaux, que l'activation de la réaction était due au fait que les réactions d'oxydation de BT avaient lieu à la surface du charbon actif.

Andreozzi *et al.* (2000, 2001) ont, eux, étudié la dégradation de plusieurs benzothiazoles en solution aqueuse par une réaction de Fenton photo-assistée dans un réacteur fermé. Dans un premier temps, ils ont développé un modèle cinétique de simulation permettant de prédire la disparition de BT en prenant en compte l'influence du pH, des concentrations en H_2O_2 et Fe(III) ou la force ionique du milieu. Le modèle donne des résultats satisfaisants par rapport à l'expérience, sauf dans le cas de pH supérieurs à 3. Les cinétiques de formation de complexes aqueux de fer et de précipitation lente d'hydroxydes de fer à ces pH sont difficiles à prendre en compte (Andreozzi *et al.*, 2000). Ils ont ensuite élargi leur étude à une série de benzothiazoles, notamment le MBT et l'OBT. Le modèle établi a permis une meilleure estimation des constantes cinétiques caractérisant l'attaque des radicaux hydroxyle sur les molécules cibles. En modulant les concentrations en H_2O_2 et en fer(III), et en ajustant le pH du milieu, une disparition totale des benzothiazoles peut être obtenue, rendant le procédé intéressant pour un traitement des eaux (Andreozzi *et al.*, 2001).

Le méthabenzthiazuron (MBTU), herbicide reconnu comme étant très photostable en solution aqueuse (pH 4-9) sous lumière naturelle, a également fait l'objet d'études de photodégradation.

Sakriß *et al.* (1976) ont étudié la photolyse directe en milieu organique du MBTU à des longueurs d'onde supérieures à 290 nm. Ces auteurs ont obtenu un mélange très complexe de photoproduits dont 14 ont pu être identifiés par différentes méthodes d'analyse (RMN 1H , MS, UV-visible, IR ...). Lors de cette photooxydation, différents mécanismes sont impliqués suivant le solvant utilisé : oxydation du groupement méthyle latéral de la chaîne urée (II), déméthylation (III), ouverture du cycle benzénique (X, XIII, XIV) et divers réarrangements conduisant à différentes poly-azines (IV, V, VI) (**Figure II.7**).

La deuxième étude photochimique menée sur le MBTU, en solution aqueuse, par Malouki *et al.* (2003) a montré que sa photolyse à $\lambda > 290$ nm est un processus très lent qui n'aura que très peu d'impact dans l'environnement. Cette faible photoréactivité du MBTU a conduit ces auteurs à regarder sa dégradation photoinduite par les ions nitrate et nitrite présents dans l'eau (Malouki *et al.*, 2005).

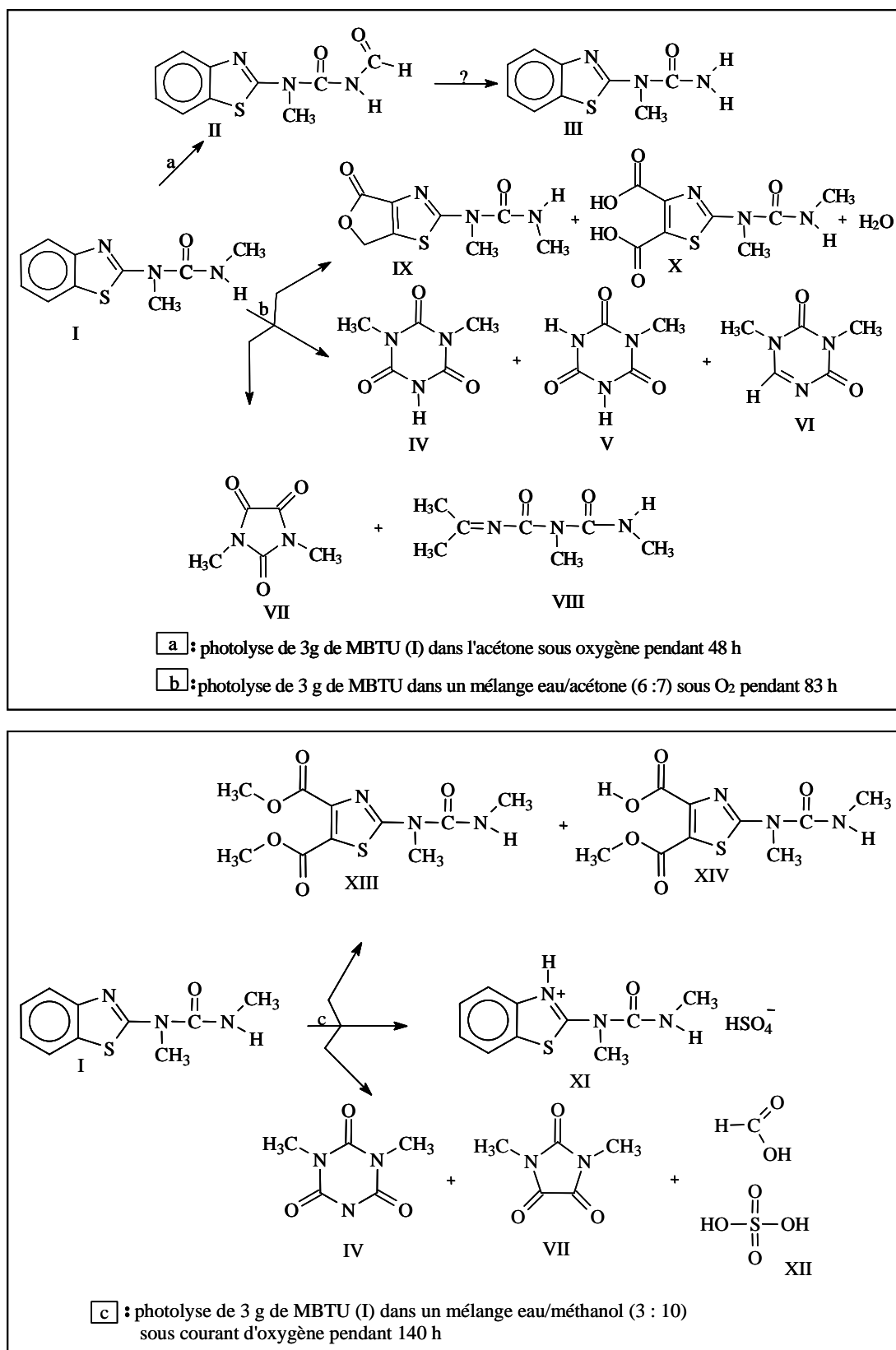


Figure II.7 : Photooxydation du MBTU à $\lambda > 290$ nm (d'après Sakriß et al., 1976)
 a) dans l'acétone, b) mélange eau/acétone, c) mélange eau/méthanol.

Les auteurs ont montré que la présence d'ions nitrate à une concentration de 0,1 mM accélère d'un facteur 10 la cinétique de photodégradation du MBTU dans l'eau. Ils ont également montré que la dégradation du MBTU photoinduite par des ions nitrate ou nitrite conduit à la formation de nombreux produits intermédiaires (oxydation du noyau aromatique et de la chaîne urée, déméthylation, nitration, ouverture du noyau aromatique conduisant à des diacides, des dialdéhydes ...) mettant en évidence la non spécificité du processus de photodégradation.

Enfin une étude très récente et originale a été menée sur le traitement par photo-Fenton des eaux de lessivage de vieux stocks de pneus usés (Sarasa *et al.*, 2006). Les principaux produits organiques identifiés dans cette eau de lessivage sont : des dérivés phénoliques, des phthalates, des acides gras, des hydrocarbures et bien sûr des dérivés du benzothiazole. Le traitement par photo-Fenton entraîne la complète élimination des dérivés du benzothiazole. Si l'on regarde le traitement des eaux de lessivage dans sa globalité, les auteurs montrent que la meilleure élimination du carbone organique est obtenue après le traitement de photo-Fenton suivi d'un processus de coagulation-flocculation faisant intervenir également des sels ferriques.

Ces quelques études sur la phototransformation des dérivés du benzothiazole mettent en avant leur faible photoréactivité en solution aqueuse. Cependant, les études réalisées sur des processus photoinduits (Fenton, Nitrates, ...) montrent une bonne efficacité pour l'élimination des benzothiazoles dans l'eau.

II.2.2 Biodégradation des benzothiazoles

II.2.2.1 Biodégradation par des boues activées ou des cultures mixtes

Les sources principales de pollution (ou du moins les plus visibles) provenant des usines de production des benzothiazoles ou de fabrication des produits finis, les premières études de biodégradation de ces xénobiotiques ont été réalisées directement avec les boues activées ou les cultures mixtes issues des stations d'épuration situées à la sortie de ces usines. L'objectif est alors de rendre le procédé de traitement des eaux industrielles chargées en benzothiazoles aussi efficace que possible. Pour cela, différents travaux consistant à étudier les conditions optimales de dégradation ont été réalisés, en particulier vis-à-vis de la concentration en polluant ou en combinant biodégradation et traitements physico-chimiques.

Mainprize *et al.* (1976) ont été les premiers à montrer que le BTSO_3 (100 mg L^{-1}) était totalement biodégradé par des boues activées. Le soufre et l'azote du xénobiotique étaient retrouvés sous forme de sulfate et d'ammonium en quantités pratiquement stœchiométriques

(dosages colorimétriques). Le taux en carbone organique du milieu, quant à lui, diminue en même temps que le taux du BTSO_3 : il semble donc qu'il n'existe pas d'intermédiaires qui s'accumulent. La cinétique de biodégradation est présentée sur la **Figure II.8**:

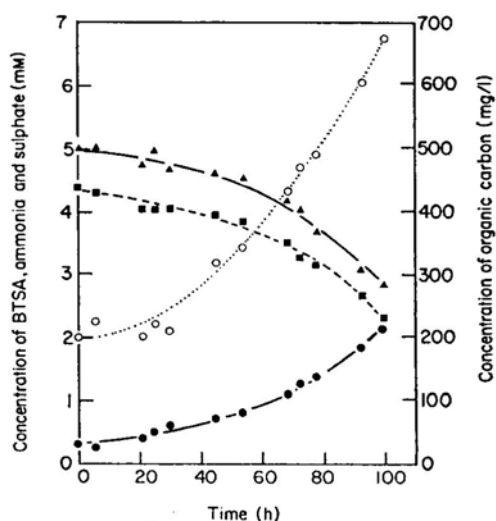


Figure II.8 : Concentration de différents éléments lors de la biodégradation du BTSO_3 par des boues activées : (▲) BTSO_3 ; (●) ammonium ; (○) sulfate ; (■) carbone organique, (d'après Mainprize et al., 1976).

Aux mêmes concentrations initiales en benzothiazole (5 mM), les auteurs observent une consommation d'oxygène comparable en présence du OBT et du BT. Gaja et Knapp (1997) montrent à leur tour une biodégradation du BT, du OBT ainsi que du ABT (à une concentration de 1 mM) avec libération de grandes quantités d'ammonium et de sulfate (par exemple 87 % et 100 % respectivement par rapport aux rendements théoriques dans le cas de ABT). Lors de ces expériences, le MBT n'est que faiblement oxydé.

Les travaux se sont ensuite portés sur le choix des cultures mixtes utilisées. Partant de boues activées adaptées aux benzothiazoles (MBT^+) et de boues activées n'ayant jamais été en contact avec ce type de composé (MBT^-), De Wever et Verachtert (1994b) ont montré que dans les deux cas, le taux de dégradation du MBT est relativement similaire (50 mg L^{-1} en 1 mois) lors de la première mise en contact. Par contre, lorsqu'on fait une seconde addition de 50 mg supplémentaire de MBT, la vitesse de dégradation est fortement accélérée, notamment dans le cas de MBT^- (**Figure II.9**).

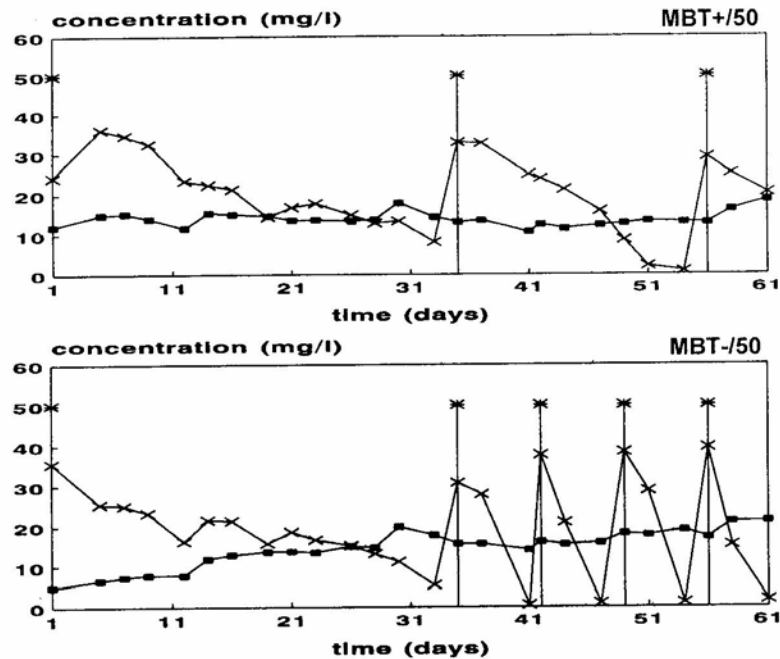


Figure II.9: Concentration de MBT (x) en fonction du temps de contact avec les boues activées MBT⁺ et MBT⁻ ; (*) ajout de 50 mg de MBT ; (■) concentration en BTSO₃ (métabolite du MBT), (d'après De Wever et Verachtert, 1994b).

Un essai réalisé avec un mélange de ces deux boues activées montre une nette accélération de la vitesse de biodégradation dès la première addition (**Figure II.10**). L'addition d'une source d'azote organique augmente encore cette vitesse.

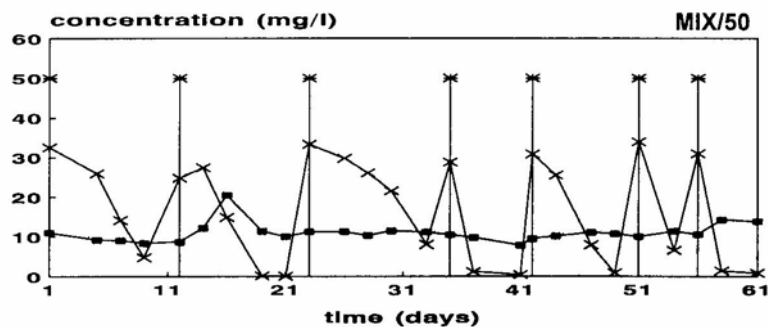


Figure II.10 : Concentration de MBT (x) en fonction du temps dans le mélange de boues activées ; (*) ajout de MBT ; (■) concentration en BTSO₃ (d'après De Wever et Verachtert, 1994b).

Cependant, plus la concentration en MBT est élevée, plus la vitesse de dégradation est ralentie, jusqu'à obtenir une inhibition totale lorsque la concentration en MBT atteint 100 mg L⁻¹ (0,6 mM) (De Vos *et al.*, 1993a).

La réalité de la biodégradation à de fortes concentrations en MBT a été mise en doute par plusieurs auteurs. De Vos *et al.* (1993b) ont ainsi proposé une oxydation chimique en disulfure à pH acide (pH < 6), qui précipite. De même, Gaja et Knapp (1998) ont envisagé un processus non-enzymatique requérant cependant la présence de matériel biologique tel que le

FAD, après avoir constaté une disparition totale du MBT avec des boues activées "mortes" (stérilisées à 121°C pendant 15 min).

Le problème se complique lorsque l'effluent est composé d'un mélange de benzothiazoles. Des expériences de biodégradation réalisées dans des réacteurs montrent que la dégradation efficace d'un mélange de BT et MBT n'est possible que si la concentration en BT est inférieure à 300 mg L⁻¹ et celle de MBT inférieure à 10 mg L⁻¹ (Repkina *et al.*, 1983). A des concentrations plus faibles (de l'ordre du mg L⁻¹), Reemtsma *et al.* (1995) observent 10 % de méthylation du MBT en MTBT (2-méthylthiobenzothiazole) et une dégradation complète du BT.

Des expériences réalisées dans des réacteurs par De Wever *et al.* (1994b) montrent que la présence simultanée de MBT et de BT stimule mutuellement leur biodégradation, même à des concentrations allant jusqu'à 150 mg L⁻¹. En revanche, le MBT semble inhiber la biodégradation du BTSO₃. Au cours de ces expériences, des composés plus polaires sont détectés mais leurs structures n'ont pas été identifiées.

Plusieurs stratégies d'élimination ont été testées, notamment au niveau d'un pré-traitement physico-chimique de l'effluent. L'utilisation d'irradiations γ de haute énergie ou d'une adsorption sur charbon activé à pH acide, suivie d'une neutralisation, d'un relargage et d'une dilution (Regula *et al.*, 1983) n'a conduit qu'à une amélioration négligeable du traitement biologique ultérieur. L'addition préalable de divers composés dans l'effluent, tels que des phosphates ou des sources de carbone et d'azote, a également été testée. Seul l'ajout de peptones, comme source d'azote et la neutralisation du milieu par NH₄OH ou Ca(OH)₂, permet l'amélioration de la cinétique de dégradation du MBT (0,25 mg L⁻¹ jour⁻¹ contre 0,16 mg L⁻¹ jour⁻¹) (De Wever, 1995).

II.2.2.2 Biodégradation dans les sols

La biodégradation de certains dérivés du benzothiazole possédant des propriétés herbicide a été suivie dans les sols.

En 1978, Cheng *et al.* se sont intéressés au devenir du MBTU dans le sol, en utilisant une molécule marquée au ¹⁴C sur des positions spécifiques. La dégradation en CO₂ est très lente et plusieurs intermédiaires ont été détectés, dont certains sont issus de réactions de déméthylation de la chaîne urée et d'autres, non identifiés, semblent se dégrader plus lentement. Cette attaque de la chaîne urée substituée est toujours préférentielle par rapport à celle de l'hétérocycle, la réaction de déméthylation étant favorisée sur l'azote terminal. La nature de la chaîne latérale affecte donc la dégradation, qui est d'autant plus rapide que le

composé de départ porte une chaîne courte : MBTU > benzthiazuron ($-\text{NHCH}_3\text{-CO-NH}_2$) > $-\text{NH-CO-NH}_2$ > ABT ($-\text{NH}_2$). Les auteurs ont également testé le méthylaminobenzothiazole et l'OBT en tant que potentiels intermédiaires stables de la dégradation du MBTU. Ces deux composés se dégradent en fait beaucoup plus rapidement que le MBTU.

Une étude réalisée dans des conditions plus proches des conditions environnementales, a été conduite par Azam *et al.* (1988) sur un sol d'une région aride pakistanaise. Ces auteurs ont mis en évidence l'effet positif sur la biodégradation du MBTU de l'amendement organique par la paille de blé, qui augmente non seulement le pourcentage de sa minéralisation mais aussi celui de son incorporation dans des composés de l'humus (acides humiques et humine). Cette formation de résidus liés augmente avec le temps d'incubation et peut varier en fonction des propriétés physico-chimiques des sols, notamment la teneur en matière organique. Ils ont également montré que la biodégradation du MBTU se faisait par co-métabolisme.

Printz *et al.* (1995) ont confirmé ces résultats en étudiant l'effet de l'amendement par la paille de maïs sur la dégradation du MBTU en laboratoire et en lysimètres. Ils ont montré que la paille radiomarkée était rapidement minéralisée (environ 45% en 45 jours) stimulant ainsi l'activité microbienne dans le sol et favorisant la disparition du MBTU. Ils ont également observé une formation plus importante, dans le sol amendé, du métabolite principal du MBTU, le méthabenzthiazuron déméthylé. L'apport de paille de maïs intensifie donc la dégradation du MBTU mais favorise également la formation de résidus liés. Des effets similaires ont été obtenus en lysimètres, les différences étant liées à la durée de l'incubation plus longue ou aux variations de température dans les sols.

Dans une étude très générale portant sur les herbicides de type phénylurée (dont le MBTU), Berger, en 1999, a suivi la transformation de 18 herbicides de cette famille dans différentes conditions ; sols amendés ou non, sols stériles inoculés par différentes souches microbiennes pures, suspension de sol. MBTU est le composé le plus persistant dans les sols, même lorsque ces sols sont amendés par une source d'azote et de la paille, avec un temps de demie-vie, dans ces conditions, variant de 36 à 59 jours suivant le sol testé. Des essais avec un sol stérilisé inoculé avec différentes souches microbiennes montrent un pourcentage de biotransformation du MBTU variant de 7 à 94% suivant la souche. Il faut noter une forte spécificité de substrats pour certaines souches vis-à-vis du MBTU (*Rhizopus japonicus* et *Cunninghamella echinulata*), alors que d'autres sont peu spécifiques mais également peu efficaces. Dans les expériences réalisées avec une suspension de sol, la vitesse de transformation augmente avec la lipophilicité des herbicides étudiés. Dans tous les cas, Berger

a trouvé que la N-déméthylation était la voie principale, mais pas la seule, pour la transformation de ces composés.

II.2.2.3 Biodégradation par des cultures pures

Afin de mieux comprendre les voies métaboliques impliquées lors des processus de biodégradation des benzothiazoles, des souches microbiennes pures capables de dégrader ou de transformer ces composés ont été recherchées. En réalité, peu de souches sont décrites dans la littérature : certaines ont été isolées à partir de stations d'épuration ou de cultures mixtes, d'autres proviennent de criblage de banques de souches.

Le **Tableau II.3** récapitule les souches microbiennes décrites et les benzothiazoles sur lesquels elles sont actives.

Souches microbiennes	Benzothiazoles	Références
Bactéries		
<i>Pseudomonas</i> sp.	MBT	Drotar <i>et al.</i> , 1987
<i>Corynebacterium</i> sp.	MBT	Drotar <i>et al.</i> , 1987
<i>Rhodococcus rhodochrous</i> OBT18	BT, OBT, ABT, MBT	De Wever <i>et al.</i> , 1997b, Besse <i>et al.</i> , 2001, Haroune <i>et al.</i> , 2001, 2002, 2003
<i>Rhodococcus erythropolis</i> BTS1	BT, OBT, ABT, BTSO ₃	De Wever <i>et al.</i> , 1998, Besse <i>et al.</i> , 2001, Haroune <i>et al.</i> , 2001
<i>Pseudomonas</i> sp. HKT 554	BT, MBT	Matsui <i>et al.</i> , 2004
<i>Rhodococcus pyrinidinovorans</i> PA	BT, OBT	Gaja et Knapp 1997, Haroune <i>et al.</i> , 2002
Champignons		
<i>Cunninghamella echinulata</i>	MBTU	Wallnöfer <i>et al.</i> , 1976
<i>Hypocrea pilulifera</i>	MBTU	Goettfert <i>et al.</i> , 1978
<i>Aspergillus niger</i>	MBTU	Malouki <i>et al.</i> , 2003

Tableau II.3 : Souches microbiennes pures décrites dans la littérature et benzothiazoles sur lesquels elles sont actives.

L'utilisation de ces souches pures a permis de mettre en évidence un certain nombre de métabolites et de proposer des voies de dégradation de différents dérivés du benzothiazole.

Biodégradation de BT et OBT

Les premières études approfondies du métabolisme de BT par les souches *Rhodococcus rhodochrous* OBT18 et *Rhodococcus erythropolis* BTS1 ont été réalisées par l'équipe de De Wever (1997b, 1998). Le suivi des biodégradations a été effectué par HPLC

en phase inverse munie d'un détecteur UV. Elles ont montré que le pH (tampon phosphate dans une gamme entre 6 et 8) influençait la vitesse de biodégradation du OBT, avec un ralentissement de celle-ci aux pH 6 et 8 par rapport à celle obtenue à pH 7. La concentration en oxygène est également importante. En effet, une diminution de la concentration en oxygène s'accompagne d'un ralentissement de la dégradation et d'une accumulation de produits colorés. En aérobiose, on constate que OBT est le premier intermédiaire de la dégradation du BT et qu'il y a accumulation d'un composé inconnu (second métabolite du BT). L'étape suivante a donc été l'identification de ce second métabolite de BT. La séparation des produits par chromatographie sur couche mince préparative, suivie d'une analyse par spectrométrie de masse, a permis d'identifier partiellement ce métabolite comme étant un dihydroxybenzothiazole (De Wever *et al.*, 1998). Cependant, la position du groupement hydroxyle supplémentaire n'a pu être déterminée, faute de techniques d'analyse performantes.

Dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe de De Wever, notre équipe (Equipe RMN métabolique et environnemental du laboratoire SEESIB) a mis en place de nouvelles conditions d'incubation en utilisant des cellules au repos (« resting cells »). Un suivi des cinétiques de dégradation par RMN ^1H *in situ* a été réalisé parallèlement à des études par HPLC. Cette approche par RMN donne des informations qualitatives et quantitatives et est réalisée directement sur les milieux d'incubation sans purification préalable (Grivet *et al.*, 2003, Delort et Combourieu, 2001). Dans ces conditions, les deux mêmes intermédiaires métaboliques de biodégradation de BT ont pu être visualisés (OBT et le dérivé dihydroxylé). La structure exacte du métabolite dihydroxylé a pu être identifiée après isolement et purification grâce à l'application originale d'une expérience RMN 2D HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation) ^1H - ^{15}N longue distance (Besse *et al.*, 2001). Ainsi nous avons pu déterminer la position du groupement hydroxyle comme étant en position 6 du cycle aromatique: le métabolite inconnu est donc le 2,6-dihydroxybenzothiazole (diOBT) (**Figure II.11**).

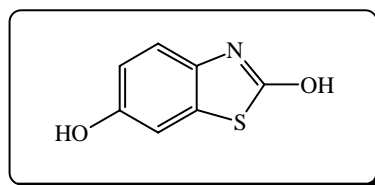


Figure II.11 : Structure du 2,6-dihydroxybenzothiazole (diOBT).

Une deuxième étude a été menée au laboratoire sur les mêmes substrats mais avec la souche *Rhodococcus pyridinovorans* PA isolée par l'équipe de J. Knapp (Haroune *et al.*,

2002). Une approche expérimentale similaire par RMN ^1H *in situ* a permis de mettre en évidence la présence de 3 métabolites (**Figure II.12**) : OBT, diOBT et un nouveau produit qui a pu être identifié par RMN 2D ^1H - ^{13}C HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence), HMBC (**Figure II.13**) et spectrométrie de masse (LC-ESI-MS-MS) comme un produit d'ouverture du cycle benzénique (diacide).

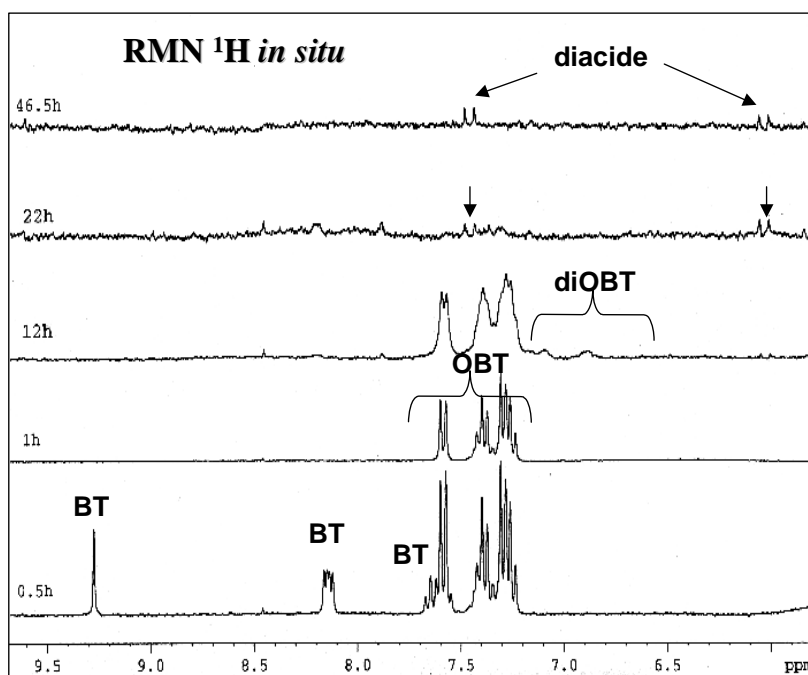


Figure II.12: Spectres RMN ^1H *in situ* enregistrés durant la biodégradation de BT par *R. pyridinovorans* PA à 0,5, 1, 12, 22 et 46,5 h.

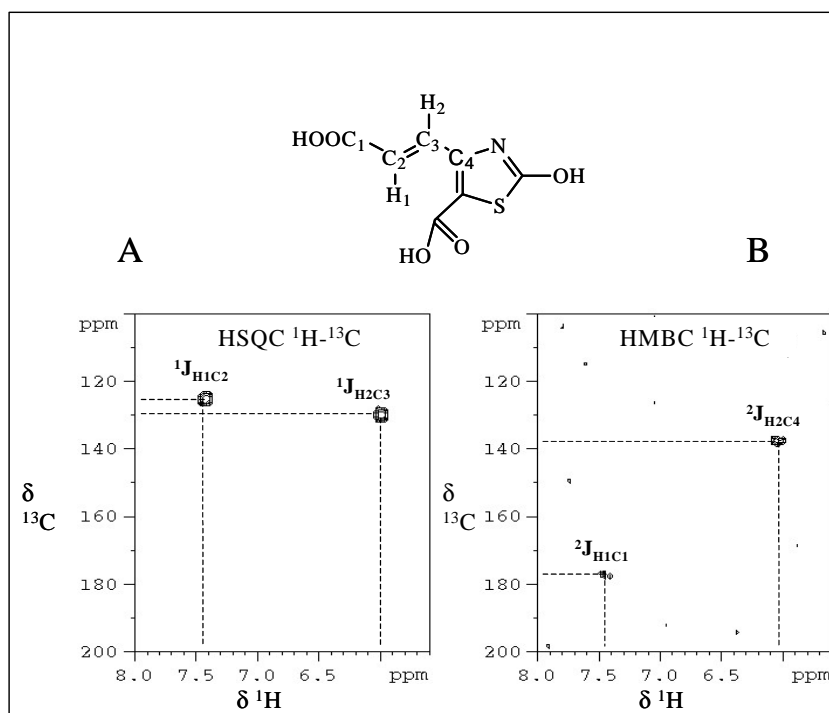


Figure II.13 : Élucidation de la structure du diacide par les expériences RMN 2D ^1H - ^{13}C HSQC (A) et ^1H - ^{13}C HMBC (B).

Une fois les métabolites identifiés, des hypothèses peuvent être faites sur la nature des enzymes impliquées dans la voie biodégradative. En plus des essais enzymatiques et des études génétiques, la RMN *in situ* s'est révélée un moyen efficace pour observer l'effet d'inhibiteurs spécifiques d'enzymes. Par exemple, dans le cas de la souche de *Rhodococcus pyridinovorans* PA, l'identification de l'intermédiaire carboxylique issu de la dégradation du BT est compatible avec une ouverture intradiol du cycle benzénique par une catéchol 1,2-dioxygénase. Pour confirmer l'activité de cette enzyme, un inhibiteur spécifique, le 3-fluorocatéchol (3FC) a été ajouté au milieu d'incubation et une inhibition immédiate du métabolisme de OBT a été observée par RMN ^1H *in situ*. De plus, il a pu être constaté que le 3FC, qui est un analogue de substrat de la catéchol 1,2-dioxygénase, a été biotransformé en parallèle en 2-fluoromuconate comme il est montré sur les spectres RMN ^1H et ^{19}F (**Figure II 14A et 14B**).

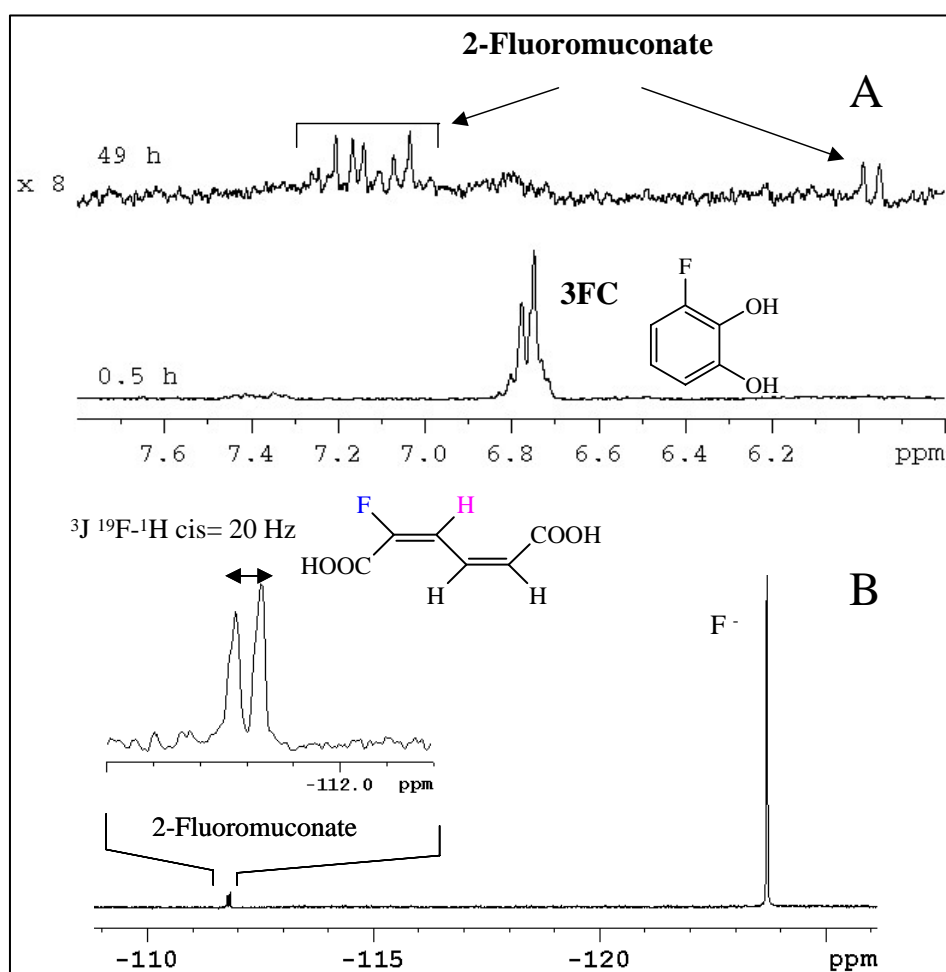


Figure II.14 : Incubation avec les cellules au repos métabolique de *R. pyridinovorans* PA en présence de 3-FC (3-fluorocatéchol). A)- Spectre RMN ^1H *in situ* à 0,5 et 49 h. B)- Spectre RMN ^{19}F *in situ* à 49 h.

Enfin l'utilisation de mutants de la souche *R. pyridinovorans* PA a permis de montrer que la première étape d'hydroxylation du BT en OBT était catalysée par une enzyme différente de la deuxième étape conduisant à la synthèse de diOBT.

Biotransformation de ABT

Peu de souches acceptent ABT comme substrat. Nous avons montré au laboratoire, par une approche similaire à celle décrite pour BT, que les souches *Rhodococcus rhodochrous* OBT18 et *Rhodococcus erythropolis* BTS1 transforment ABT en son dérivé hydroxylé en position 6 du cycle benzénique (2-amino-6-hydroxybenzothiazole), mais ce métabolite s'accumule dans le milieu sans être dégradé (**Figure II.15**) (Haroune *et al.*, 2001).

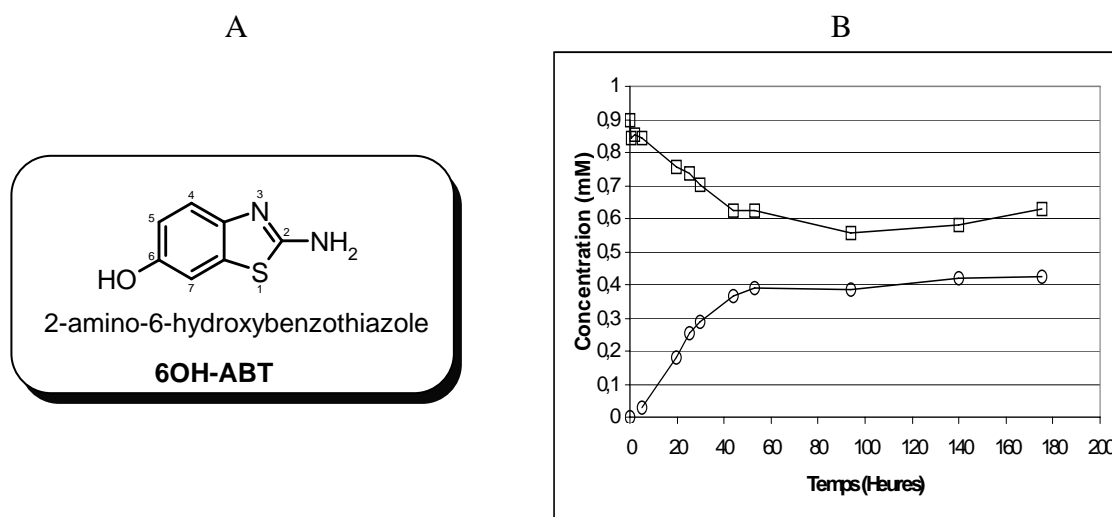


Figure II.15 : A) Structure du 2-amino-6-hydroxybenzothiazole (6OH-ABT), B) Cinétique de transformation d'ABT (□) et de formation du 6OH-ABT (○) par *Rhodococcus rhodochrous* OBT18.

Biotransformation du MBT

MBT est particulièrement difficile à dégrader avec des cultures pures.

Différentes études portant sur la biodégradation du MBT par des souches isolées ont été réalisées avec plus ou moins de succès. Karelova et Tomasovicova (1988) ont montré une disparition de 74 % du MBT après cinq semaines d'incubation avec des bactéries sulfato-réductrices dans des conditions anaérobies, la concentration initiale en MBT étant de 5 mg L⁻¹ (0,03 mM). De nombreuses autres souches bactériennes ont été testées. Elles ne sont pas capables de minéraliser MBT mais peuvent le biotransformer en conduisant généralement

au 2-(méthylthio)benzothiazole (MTBT). C'est le cas par exemple de *Pseudomonas* sp. ou de *Corynebacterium* sp. (Drotar *et al.*, 1987) (**Figure II.16**).

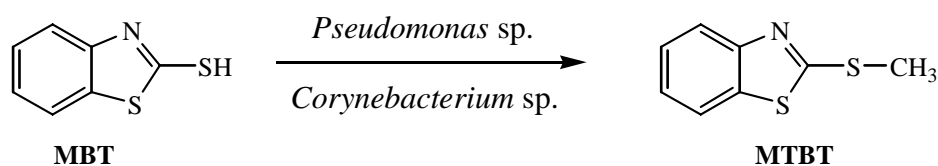


Figure II.16 : Biotransformation du MBT par *Pseudomonas* sp. ou *Corynebacterium* sp.

Une étude très complète a été menée au laboratoire avec une souche de *Rhodococcus rhodochrous* OBT18, en utilisant notre stratégie habituelle (Haroune *et al.*, 2004). Ce travail a permis de montrer pour la première fois une minéralisation partielle (30%) de MBT par une souche pure.

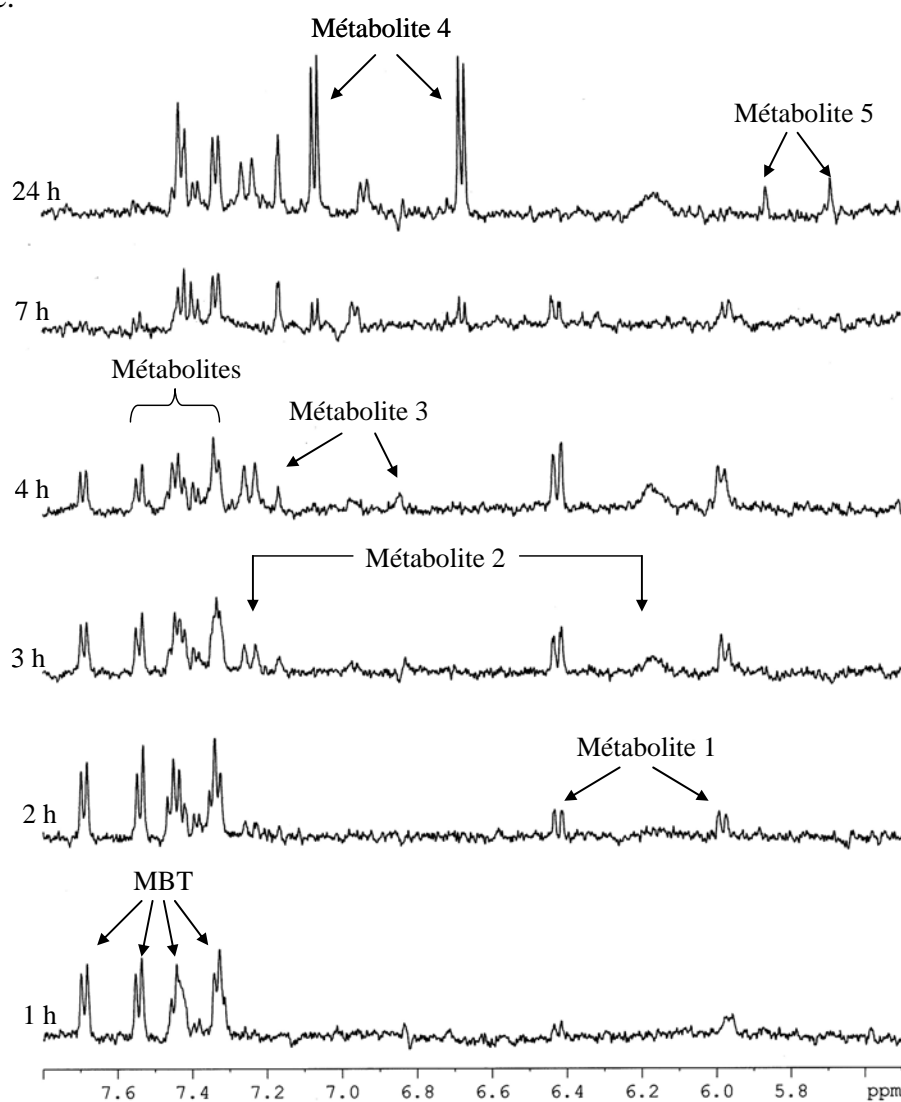


Figure II.17 : Cinétique de dégradation du MBT par *Rhodococcus rhodochrous* obtenue par RMN ^1H *in situ*.

La **Figure II.17** montre la présence de plusieurs intermédiaires métaboliques dans les spectres RMN ^1H *in situ* enregistrés lors de l'incubation de la souche *R. rhodochrous* avec MBT.

On retrouve la formation du dérivé hydroxylé en position 6 (6-hydroxy-2-mercaptobenzothiazole 6OH-MBT, métabolite 3) et du diacide du MBT (métabolite 2). Un nouveau type de métabolite a pu être identifié, il s'agit du *cis*-6,7-dihydrodihydroxy-2-mercaptobenzothiazole (métabolite 1, dihydrodiol). Malgré des efforts importants, la structure des métabolites 4 et 5 n'a pu être résolue, il s'agit cependant de composés ayant conservé la structure thiazole. La structure des 3 métabolites identifiés est présentée dans la **Figure II.18**.

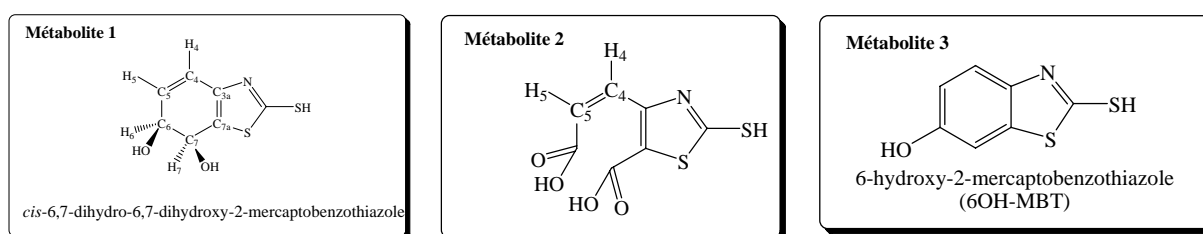


Figure II.18 : Structure des métabolites 1, 2 et 3.

Conclusion : Métabolisme des benzothiazoles par les souches de *Rhodococcus*

En conclusion, il a été possible en utilisant l'approche RMN ^1H d'étudier la voie biodégradative de quatre benzothiazoles incluant BT, OBT ABT et MBT par trois souches bactériennes appartenant au genre *Rhodococcus*. L'hydroxylation des dérivés benzothiazoles sur le cycle aromatique en position 6 représente l'étape commune de cette voie.

L'identification du diacide et du 2-fluoromuconate a permis de mettre en évidence une catéchol 1,2-dioxygénase et de montrer que la souche *Rhodococcus pyridinovorans* PA dégrade BT et OBT selon la voie *ortho* des catéchols.

L'identification du diol dihydrogéné dans le cas particulier du MBT montre d'une part que le catéchol (précurseur du diacide) impliqué dans la voie métabolique du MBT pourrait être formé selon deux voies parallèles, et d'autre part, qu'une dioxygénase hydroxylante est présente chez la souche *Rhodococcus rhodochrous*.

Le fait de retrouver des métabolites communs chez ces deux souches de *Rhodococcus* (composé diacide) nous laisse penser que le mécanisme de dégradation des benzothiazoles peut être généralisable (**Figure II.19**) :

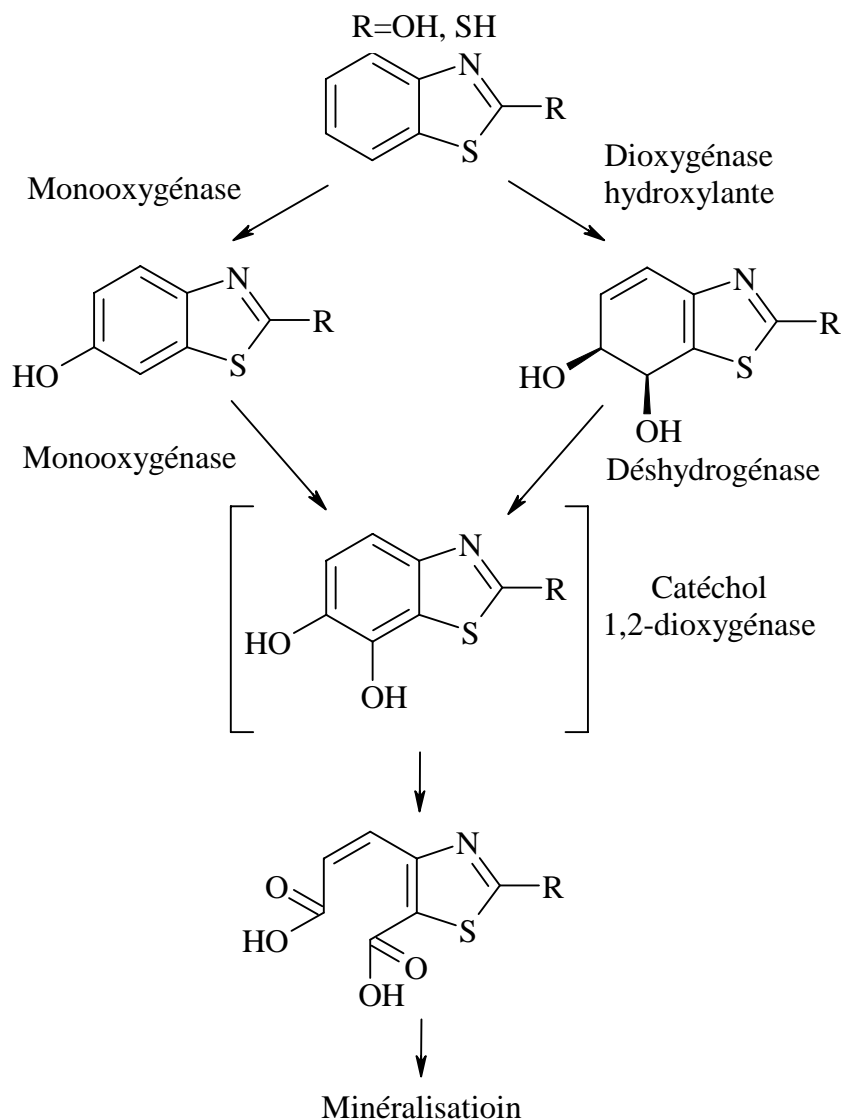


Figure II.19: Voies métaboliques impliquées dans la biodégradation du OBT et du MBT par les souches de *Rhodococcus*.

Dans la première voie, le produit de départ est hydroxylé en position 6 du cycle aromatique, puis en position 7 par deux monooxygénations successives pour conduire au catéchol. Dans une voie parallèle, le diol dihydrogéné est obtenu suite à l'action d'une dioxygénase hydroxylante, puis déshydrogéné enzymatiquement pour conduire au catéchol. Le cycle aromatique du catéchol est ensuite clivé par une catéchol 1,2-dioxygénase pour conduire au diacide que nous avons mis en évidence.

Biotransformation du MBTU

Wallnöfer et *al.* (1976) ont étudié la biotransformation du MBTU en présence du zygomycète *Cunninghamella echinulata*. Ils ont montré que cette souche transformait

l'herbicide en deux métabolites M_1 et M_2 . M_1 a été identifié par spectrométrie de masse et ^1H RMN comme correspondant au benzthiazuron (M_1). Il s'agit donc d'une réaction de déméthylation. M_2 correspond, lui, à une hydroxylation du cycle benzénique sur le carbone 6.

Une autre étude réalisée par Goettfert *et al.* (1978) a porté sur la transformation microbienne du MBTU marqué au ^{14}C par une souche fongique *Hypocrea pilulifera*, isolée du sol. Après 7 semaines d'incubation, 16% du $[^{14}\text{C}]$ MBTU était dégradé. Cinq métabolites ont pu être isolés par chromatographie sur colonne, et caractérisés à l'aide de méthodes spectroscopiques et chromatographiques (**Tableau II.4**).

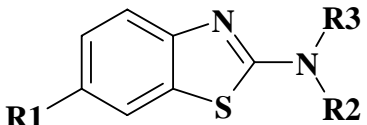
			
	R1	R2	R3
1	H	CH ₃	CONHCH ₃ Méthabenzthiazuron
2	H	CH ₃	CONHCH ₂ OH
3	H	CH ₃	CONH ₂
4	H	H	CONHCH ₃ Benzthiazuron
5	H	CH ₃	H
6	OH	CH ₃	CONHCH ₃

Tableau II.4 : Principaux métabolites isolés après transformation du méthabenzthiazuron par *Hypocrea pilulifera* (Goettfert *et al.*, 1978).

Plus récemment, Malouki *et al.* (2003) ont montré que la biotransformation du MBTU par le champignon *Aspergillus niger* s'arrêtait au stade de l'hydroxylation du cycle benzénique en position 6 (produit majoritaire) et position 5 (produit minoritaire) (**Figure II.20 A**). Là encore les expériences de RMN 2D ^1H - ^{15}N HMBC ont permis de caractériser ces produits sans ambiguïté (**Figure II.20 B**).

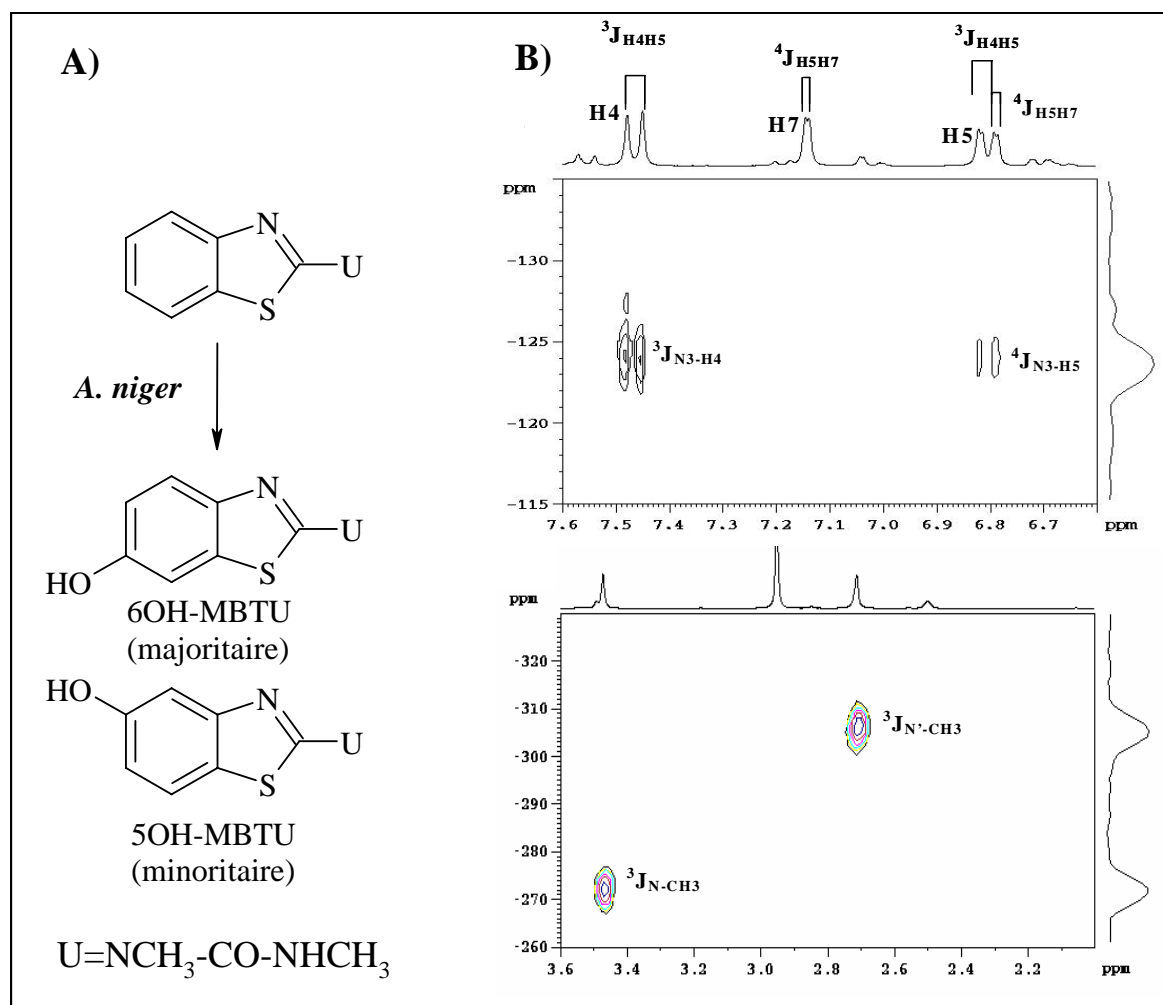


Figure II.20 : A) Métabolites obtenus lors de l'incubation du MBTU avec *A. niger* B) Expérience RMN 2D 1H - ^{15}N HMBC.

II.2.3 Processus combiné de photo- et biodégradation

Comme nous l'avons vu à plusieurs reprises, la photo ou la biotransformation de dérivés du benzothiazole sont souvent difficiles et conduisent à l'accumulation de produits intermédiaires sans minéralisation totale.

De ce fait, il est intéressant de combiner ces deux processus soit de manière consécutive, soit simultanément. Quelques exemples existent dans la littérature (Ito *et al*, 1998 ; Kot-Wasik *et al.*, 2004 ; Wang G-S *et al.*, 2001, etc). Nous allons illustrer notre propos avec le cas du méthabenzthiazuron traité au laboratoire.

Comme nous l'avons décrit plus haut, la biotransformation du MBTU par une souche pure d'*Aspergillus niger* conduit à la formation de dérivés hydroxylés en 6 ou en 5 du cycle benzénique mais la dégradation biotique s'arrête à ce stade. Par ailleurs le MBTU ne se transforme pas par photolyse directe. Malouki *et al.* (2003) ont montré que le dérivé 6-hydroxyméthabenzthiazuron (6OH-MBTU) pouvait se transformer sous irradiation solaire car il peut absorber une partie des longueurs d'onde correspondantes (**Figure II.21**).

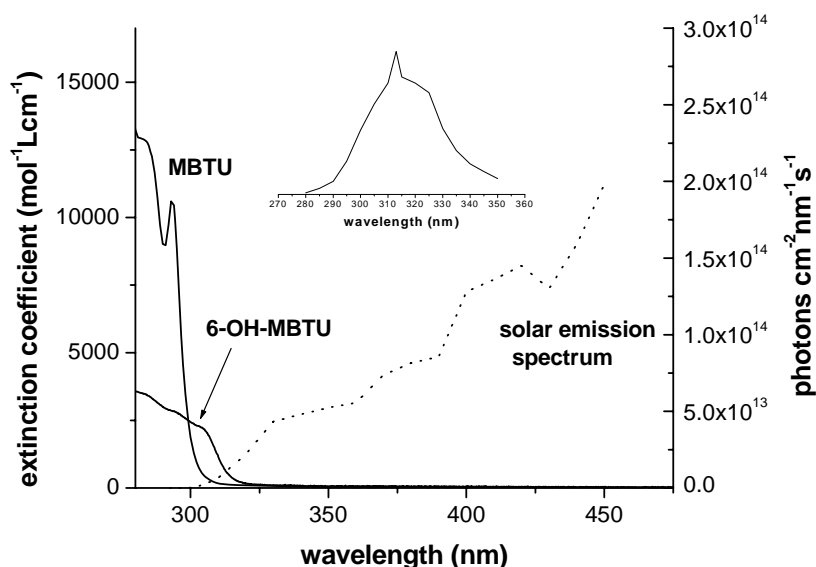


Figure II.21: Spectres UV du MBTU et du 6-hydroxyméthabenzthiazuron (6OH-MBTU) dans l'eau neutre. Spectre d'émission solaire en été. Insert : Spectre d'émission des lampes solaires Duke (SNEE, Aubervilliers, France) filtré par du Pyrex.

Une étude cinétique de la phototransformation du 6OH-MBTU a été suivie par HPLC couplée à un détecteur UV et a montré la présence de 3 photoproduits principaux (P1, P2, P3) (**Figure II.22**). Une analyse par LC-MS-MS a permis de déterminer la structure des 3 photoproduits et de proposer un mécanisme réactionnel (**Figure II.23**).

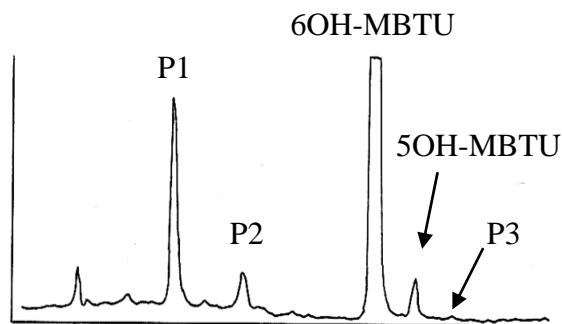


Figure II.22 : Chromatogramme d'un échantillon du 6OH-MBTU (10^{-4} M) irradié dans la gamme de longueurs d'onde comprises entre 290 et 350 nm pendant 2 h.

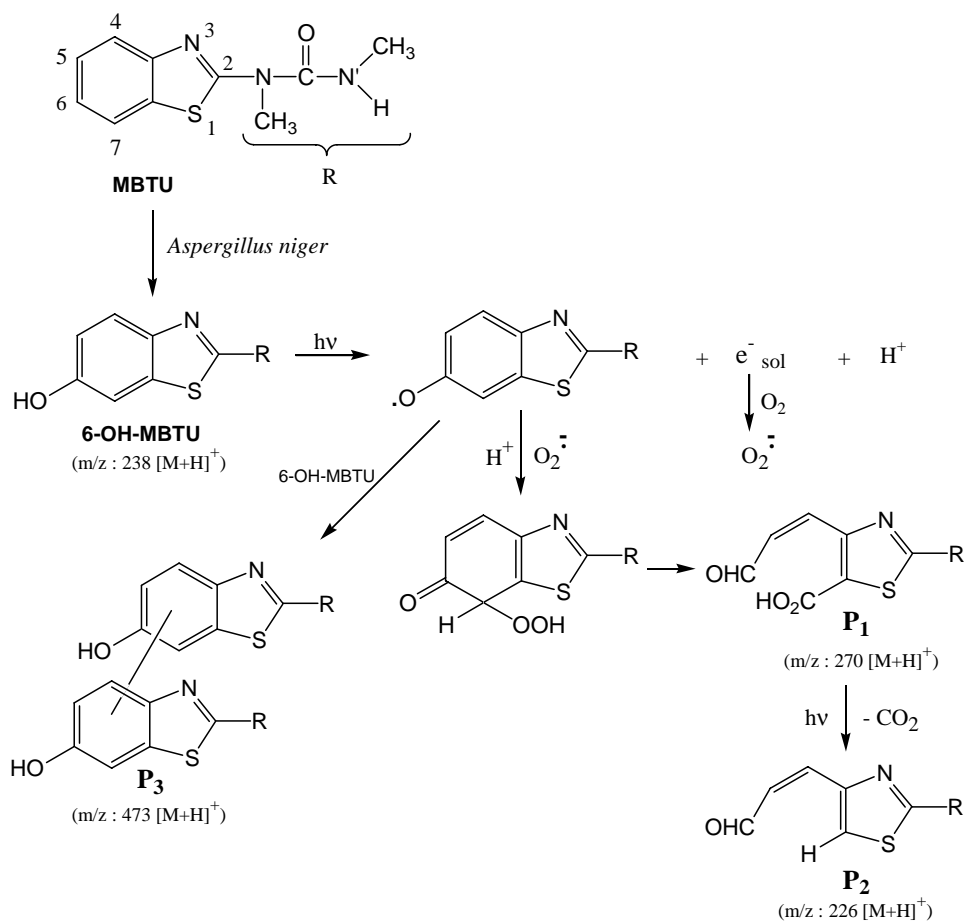


Figure II.23 : Structure des photoproduits P1, P2 et P3 et proposition du mécanisme réactionnel.

Cet exemple montre clairement la complémentarité des transformations successives de bio puis de phototransformation du MBTU.

II.3 ROLE DU FER EN TANT QUE PHOTOINDUCTEUR ET DANS LES PROCESSUS ENZYMATIQUES LORS DE LA DEGRADATION DE POLLUANTS

II.3.1 Le Fer dans l'environnement

II.3.1.1 Le fer dans les eaux naturelles

Le fer est le métal de transition le plus abondant dans l'environnement. Il est présent dans les roches, dans les sols, dans le compartiment aquatique (complexes solubles ou bien suspension d'oxydes insolubles) et dans l'atmosphère (nuages). Il est nécessaire à la vie de nombreuses espèces et il joue un rôle très important dans la biosphère, en particulier dans l'activité des protéines et des enzymes (Pehkonen *et al.*, 1992).

Le fer en phase solide (majoritairement du fer(III)) est essentiellement lié à l'oxygène pour former des hydroxydes et des oxydes de fer amorphes qui jouent un rôle très important dans le cycle naturel du fer pour les systèmes biologiques. Il existe de nombreux oxy-hydroxydes de fer et les plus courants sont l'hématite (α -Fe₂O₃), la maghémite (γ -Fe₂O₃), la goethite (α -FeOOH) et la lépidocrocite (γ -FeOOH). La goethite est la forme cristalline la plus stable thermodynamiquement (Goldberg *et al.*, 1993). Ils sont peu solubles dans l'eau mais ils absorbent fortement la lumière jusqu'à 700 nm et peuvent subir des réactions de photodissolution. Parallèlement, il existe de nombreuses réactions thermiques qui peuvent réduire le fer(III).

Dans les eaux naturelles, les ligands forts tels que les carboxylates peuvent induire la dissolution des oxydes de Fe(III) présents en suspension ou dans les sédiments. En effet, en présence de composés tels que les acides mono ou dicarboxyliques, une photodissolution réductrice des oxy-hydroxydes de fer a été observée et considérée comme une oxydation du composé organique complexant. Pour ces raisons, les oxy-hydroxydes de fer sont parmi les composants les plus chimiquement réactifs de la matière en suspension dans le compartiment aquatique (Cunnigham *et al.*, 1988). Tous ces phénomènes ont une influence sur le cycle du fer dans l'environnement.

Le fer peut être complexé par différents types de ligands : carboxylates (Balzani et Carassiti, 1970), phénolates (Dessai et Milburn, 1969), anions inorganiques tels que les ions chlorure (Langford et Carey, 1975). Il est également impliqué dans les réactions d'oxydoréduction avec de nombreux métaux comme le chrome (Buerge et Hug, 1997) ou le cuivre (Stone et Hug, 1984a et b).

Dans les compartiments aquatiques, sa concentration peut varier de 0,2 nM dans les eaux de surface des océans (Martin *et al.*, 1990) à 400 µM dans les nuages urbains pollués (Conklin et Hoffmann, 1988). Dans certaines eaux de ruissellement particulièrement acides, la concentration peut être plus importante si le sol considéré a une teneur en fer élevée.

Du point de vue de l'environnement, le fer reste toujours le métal de transition le plus important en raison de sa concentration qui est en général d'un ordre de grandeur plus élevée que celle des autres métaux de transition.

Globalement, le fer dans les milieux naturels (lacs, rivières ...) est majoritairement sous forme de fer(III) plutôt que de fer(II). La faculté du fer(II) de s'oxyder et du fer(III) de se réduire de manière cyclique est un phénomène essentiel pour la chimie et la biologie de l'eau.

Parmi les espèces de fer solubles dans l'eau, on retrouve les complexes aqueux suivants : $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$, $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_5(\text{OH})]^{2+}$, $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_4(\text{OH})_2]^+$, $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{OH})_3]^0$, $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{OH})_4]^-$, éventuellement $[\text{Fe}_2(\text{H}_2\text{O})_8(\text{OH})_2]^{4+}$ selon le pH et la concentration. Eberle et Palmer (1986) ont mesuré les concentrations en fer et identifié les différentes espèces solubles dans le Rhin : sur 407 µg.L⁻¹ de fer(III) total, seulement 1,6 µg.L⁻¹ de fer(III) est sous forme vraiment dissoute (après filtration à 0,4 µm), dont 39 % de $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_4(\text{OH})_2]^+$, 28 % de $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{OH})_3]^0$ et 13% de $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{OH})_4]^-$, le reste des espèces solubles n'a pas été identifié mais peut être des colloïdes de fer(III) soluble. La grande différence entre les espèces vraiment solubles et la concentration en fer total mesurée peut être aussi attribuée à des oxydes, des colloïdes de plus grandes tailles et des complexes avec la matière organique.

Par contre dans l'atmosphère (nuage, brouillard, pluie), le fer est très souvent majoritairement sous forme de fer(II). La source du fer dans ce milieu naturel (hydrométéores) et des métaux en général est principalement l'aérosol incorporé dans la phase liquide soit en agissant comme noyau de condensation soit par les processus d'impaction entre l'aérosol interstitiel et les gouttelettes de nuage. Les surfaces d'aérosols provenant de la combustion et des émissions de certaines industries sont particulièrement enrichies en métaux (Siefert *et al.*, 1996), souvent très solubles aux niveaux d'acidité typique des hydrométéores (pH moyen = 5,2) (Weschler *et al.*, 1986).

II.3.1.2 Les transformations du fer en solution aqueuse

Le fer est employé intensivement dans le traitement des eaux et plus particulièrement des eaux usées. Il est utilisé à la fois comme coagulant, adsorbant et catalyseur redox dans le traitement des eaux depuis plusieurs années. Ces applications très répandues ne posent pas de problèmes particuliers, il est cependant recommandé de ne pas dépasser 5 ppm pour ne pas

perturber les écosystèmes. Par contre, la difficulté liée à ces applications provient de la chimie aqueuse du fer qui est très complexe et de son interaction avec d'autres espèces.

Une partie de la complexité de la chimie aqueuse du fer est schématisée dans la **Figure II.24** dans laquelle les transformations les plus importantes du fer en solution sont représentées. Le fer peut exister en solution très majoritairement sous forme de fer ferreux et fer ferrique. Cependant, il y a également des évidences pour l'existence d'autres états de valence comme le fer(IV) (ferryl) (Pignatello, 1992) et le fer(VI) (ferrate) (Neveux *et al.*, 1994).

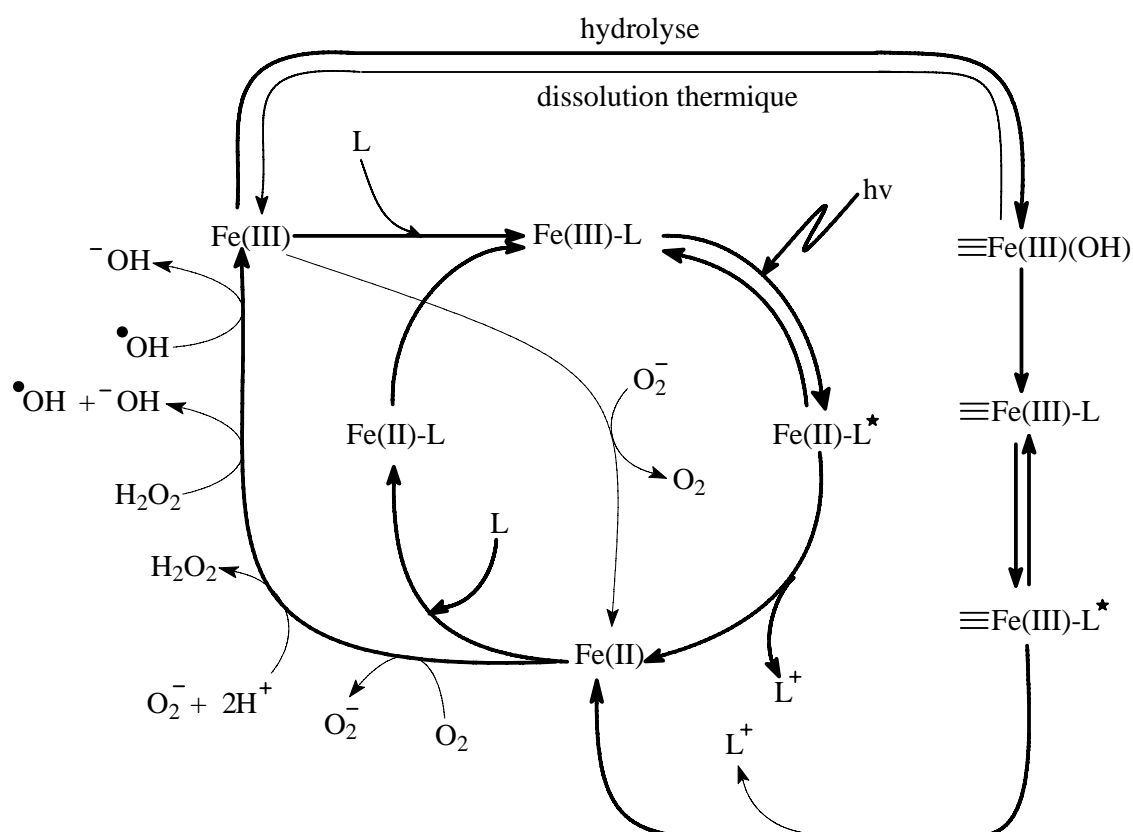
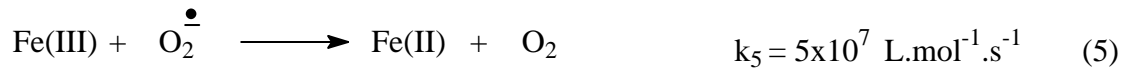
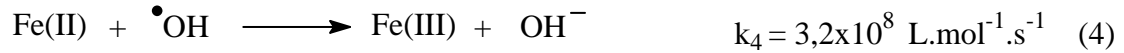
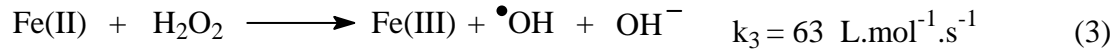
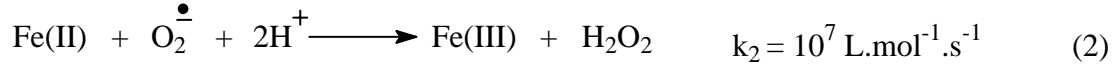
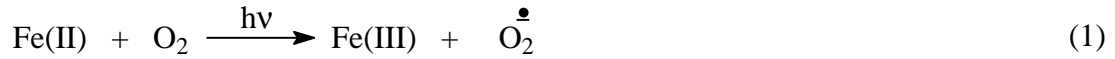


Figure II.24 : Schéma des différentes transformations de fer(III) et fer(II) qui peuvent se produire en solution aqueuse : Fe(II)-L et Fe(III)-L représentent le fer ferrique et ferreux complexés par un ligand L , $\equiv\text{Fe(III)(OH)}$ et $\equiv\text{Fe(III)-L}$ représentent les espèces attachées à la surface d'(oxy)hydroxides de fer et Fe(II) et Fe(III) représentent les ions ferreux et ferriques aqueux.

En présence d'oxygène, le fer ferreux sera oxydé en fer ferrique à un taux qui est fortement dépendant du pH. L'augmentation de la vitesse d'oxydation du fer(II) avec le pH a été attribuée à une plus grande réactivité de l'oxygène vis-à-vis des formes Fe(OH)^+ et Fe(OH)_2 que pour la forme Fe^{2+} . Ce processus produira le radical superoxyde, qui est une forme réduite de l'oxygène plus réactive. Ce radical superoxyde peut à son tour réagir avec le

fer ferreux pour produire H_2O_2 qui permet *via* la réaction de Fenton d'obtenir des radicaux $\bullet\text{OH}$ plus réactifs et plus puissants en terme d'oxydation (Rose et Waite, 2002) :



Le radical $\bullet\text{OH}$ peut réagir sur le fer(II) pour redonner du fer(III). Le fer ferrique produit peut avoir plusieurs voies d'évolution, il va tout d'abord subir des mécanismes d'hydrolyse qui peuvent le conduire jusqu'à la précipitation sous forme de trihydroxyde de fer ($\text{Fe(OH)}_{3(s)}$). Cependant il faut également noter qu'il peut être complexé par la matière organique (L) et conservé sous forme soluble. Sa réduction est également un processus très probable soit par exemple *via* le radical superoxyde soit par un mécanisme de photooxydoréduction à partir des complexes fer(III)-L formés avec la matière organique. Il faut aussi souligner que les processus de photooxydoréduction généralement observés avec les complexes solubles sont identiques et accompagnés d'un processus de photodissolution à partir des oxy-hydroxydes de fer (Waite et Morel, 1984).

Ces processus sont généralement observés dans les systèmes aquatiques naturels (Waite *et al.*, 1995 ; Emmenegger *et al.*, 2001). Ils ont un rôle primordial, en maintenant un approvisionnement suffisant du fer soluble pour le phytoplancton marin, maillon essentiel de la chaîne alimentaire (Price et Morel, 1998 ; Barbeau *et al.*, 2001).

Comme nous l'avons signalé précédemment, le fer joue également un rôle important dans l'atmosphère, à travers le même type de cycle représenté dans la **Figure II.25** (Behra et Sigg, 1990). A travers ce cycle, le fer peut intervenir sur tous les autres cycles des éléments importants du compartiment atmosphérique.

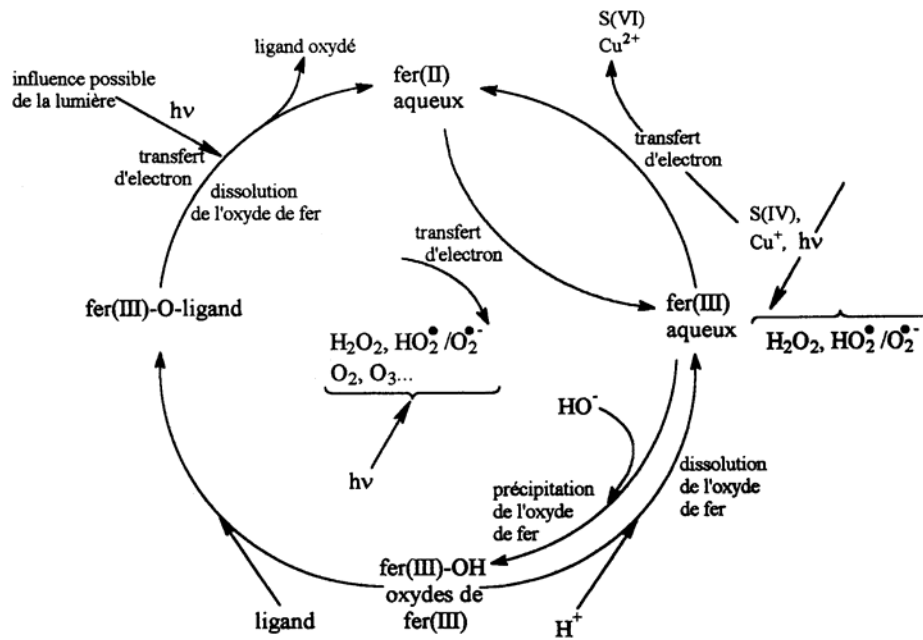


Figure II.25 : Cycle du fer dans l'eau atmosphérique selon Behra et Sigg (1990).

II.3.1.3 Les espèces de fer(III) en solution aqueuse

Le fer dans son état d'oxydation (+3) va former des complexes de faible poids moléculaire tels que :

- Le monomère $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$, correspondant au cation Fe^{3+} entouré de 6 molécules d'eau, noté plus simplement Fe^{3+} (**Figure II.26**).

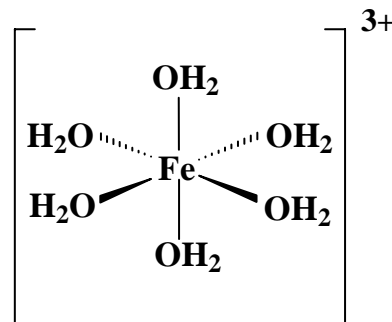


Figure II.26 : Structure octaédrique du complexe $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$.

- Le monomère $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_5(\text{OH})]^{2+}$ ou $\text{Fe}(\text{OH})^{2+}$ dans lequel une molécule d'eau a été substituée par un groupement hydroxyde.

- Le monomère $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_4(\text{OH})_2]^+$ ou $\text{Fe}(\text{OH})_2^+$ dans lequel deux molécules d'eau ont été substituées par deux groupements hydroxyde.

- Le dimère $[(\text{Fe})_2(\text{H}_2\text{O})_8(\text{OH})_2]^{4+}$ ou $(\text{Fe})_2(\text{OH})_2^{4+}$ dont la structure est décrite dans la **Figure II.27** :

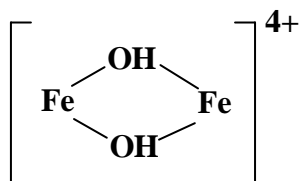


Figure II.27 : Structure proposée pour le dimère de fer(III) par Sommer et Margerum (1970).

Le fer(III) peut aussi donner des polymères hydrosolubles $[\text{Fe}_n(\text{OH})_m(\text{H}_2\text{O})_x]^{(3n-m)+}$ tels que :

- Des complexes trimères qui semblent exister sous deux formes possibles, $[\text{Fe}_3(\text{OH})_3(\text{H}_2\text{O})_{12}]^{6+}$ ou $[\text{Fe}_3(\text{OH})_3]^{6+}$ et $[\text{Fe}_3(\text{OH})_4(\text{H}_2\text{O})_{14}]^{5+}$ ou $[\text{Fe}_3(\text{OH})_4]^{5+}$ représentées sur la **Figure II.28** :

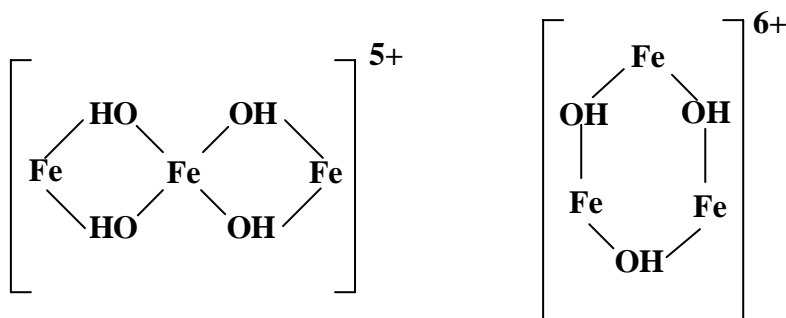


Figure II.28 : Structures proposées pour les trimères de fer(III) par Sommer et Margerum (1970).

- Des oligomères, des polymères ou des agrégats de fer(III) solubles sont également présents en solution mais leur structure n'a jamais été identifiée de manière précise.

- Enfin, des oxydes de fer(III) sont également présents sous forme de particules en suspension comme par exemple : α et γ - $\text{FeO}(\text{OH})$ (goethite et lépidocrocite), α et γ - Fe_2O_3 (hématite et magnétite) ou encore $\text{Fe}(\text{OH})_3$ (ferrihydrite).

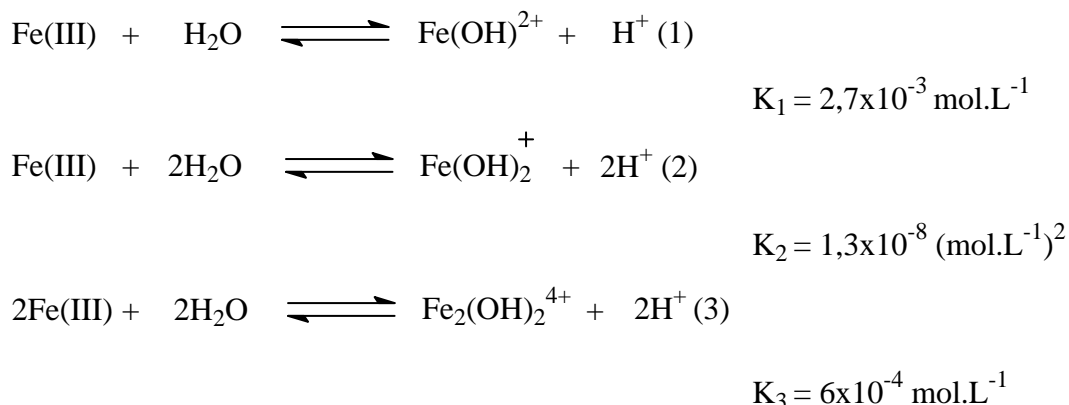
Remarque : Dans la suite de la thèse, les molécules d'eau qui complètent la coordination autour du fer ne seront plus indiquées dans les formules chimiques pour des raisons de simplicité.

Ces différentes espèces de fer(III) ont une réactivité chimique et un comportement sous irradiation distincts en solution aqueuse. Des études antérieures ont montré que la

spéciation du fer(III) dépend de plusieurs facteurs dont le pH et la concentration initiale en fer(III).

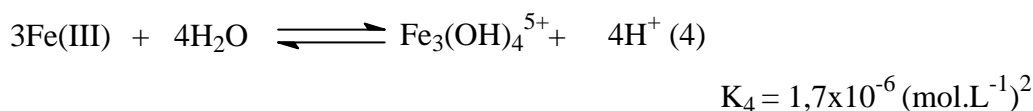
Influence du pH

L'influence du pH est directement liée aux équilibres de dissociation qui régissent, en partie, la distribution des différentes espèces de fer(III) en solution aqueuse. Dans des domaines de $\text{pH} \leq 5$, plusieurs ions ferriques existent en solution aqueuse : Fe^{3+} , $\text{Fe}(\text{OH})^{2+}$, $\text{Fe}(\text{OH})_2^+$ et le dimère $\text{Fe}_2(\text{OH})_2^{4+}$ à plus forte concentration en fer. La distribution de ces espèces est normalement contrôlée et gouvernée par les équilibres suivants :

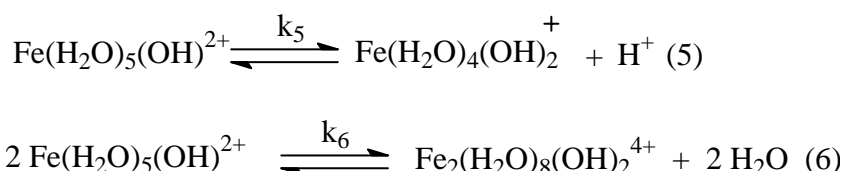


Les valeurs des constantes d'équilibre ont été déterminées par Faust et Hoigné (1990), à 298 K et avec une force ionique de 0,03 M (Flynn, 1984). La proportion de chacun des complexes monomères dépend du pH de la solution.

On peut ajouter une autre réaction d'équilibre du fer(III) qui conduit au complexe trimère.



La formation des espèces monomère $\text{Fe}(\text{OH})_2^+$ et dimère $\text{Fe}_2(\text{OH})_2^{4+}$ a également été décrite à partir de l'espèce $\text{Fe}(\text{OH})^{2+}$ (Murray, 1974).



En ce qui concerne les vitesses des équilibres (1) et (5), Hemmes *et al.*, (1971) ont montré que l'équilibre (1) était très rapide par rapport à l'équilibre (5). Ainsi, ils proposent les valeurs suivantes $k_1 > 3 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$ et $k_5 = 6,1 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$. Ce comportement particulier des complexes

aqueux de fer(III) est différent du comportement des complexes $\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$, $\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$ ou $\text{Ir}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$ pour lesquels k_1 est de l'ordre de 10^5 s^{-1} (Hemmes et al., 1971). Pour ces auteurs, la différence est liée au fait que le pK de Fe^{3+} est de l'ordre de 2 alors qu'il est de l'ordre de 5 pour les autres complexes cités. Nous pouvons donc conclure qu'après la dissolution des cristaux de fer(III) en milieu faiblement acide, le complexe Fe^{3+} existera en faible quantité et le complexe $\text{Fe}(\text{OH})^{2+}$ sera rapidement formé.

Sur la **Figure II.29**, nous avons représenté la distribution des trois complexes aqueux de fer(III) de bas poids moléculaires en fonction du pH. Cette distribution a été déterminée à partir des constantes d'équilibre citées précédemment.

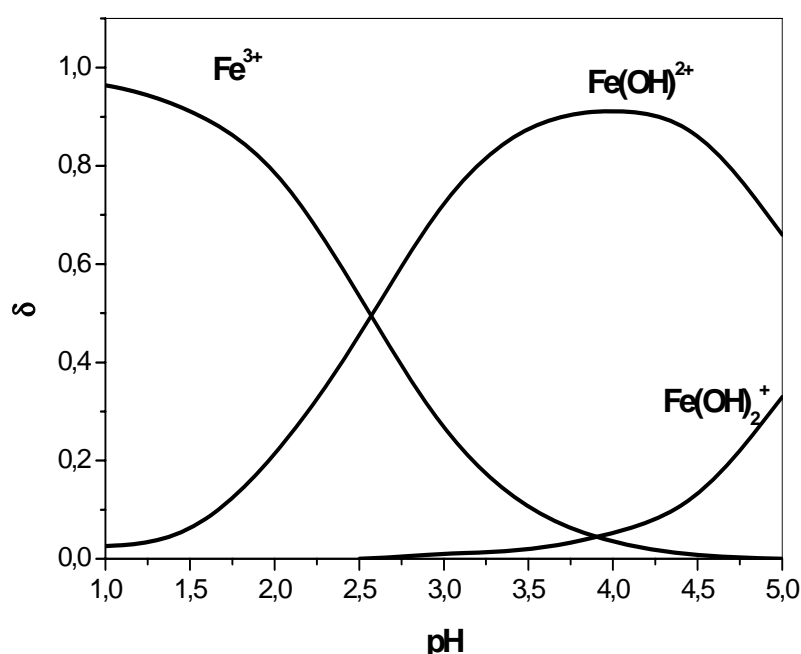


Figure II.29 : Diagramme de distribution des complexes monomères de fer(III) en fonction du pH, à 298 K et à force ionique égale à 0,03 M.

Influence de la concentration

Les espèces de fer(III) présentes dans la solution dépendent aussi de la concentration initiale en fer(III). En effet, Flynn (1984) a établi des domaines de prédominance de ces complexes en fonction à la fois du pH et de la concentration (**Figure II.30**).

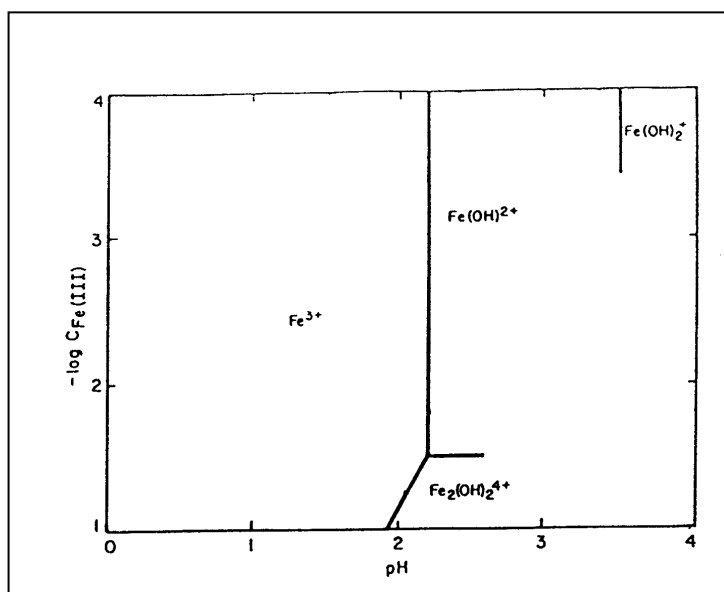


Figure II.30 : Domaine de prédominance des complexes de fer(III) en fonction à la fois du pH et de la concentration (d'après Flynn, 1984).

D'après la figure ci-dessus, les complexes dimères seront seulement présents dans des solutions très concentrées en fer(III) ($>5 \times 10^{-2}$ M).

II.3.1.4 Caractérisation des complexes aqueux de fer(III) par spectrophotométrie

Les différences structurales des espèces monomères de fer(III) en solution aqueuse impliquent que leurs spectres d'absorption UV-visible soient différents (**Figure II.31**). Le spectre d'absorption d'une solution de fer dépendra donc de la présence et de la proportion de chaque espèce en solution. Il va évoluer en même temps que les équilibres s'instaurent.

- Le spectre d'absorption UV-visible du complexe Fe^{3+} ou $Fe(H_2O)_6^{3+}$ présente un maximum à 240 nm, avec un coefficient d'absorption molaire de 3850 à 4500 $M^{-1}.cm^{-1}$ (Langford *et al.*, 1975 ; Knight et Sylva, 1975 ; Milburn, 1956).

- Le spectre d'absorption UV-visible du complexe $Fe(OH)^{2+}$ ou $Fe(H_2O)_5(OH)^{2+}$ est caractérisé par un maximum à 297 nm avec un coefficient d'absorption molaire de l'ordre de 2000 $M^{-1}.cm^{-1}$ (Weschler *et al.*, 1986 ; Faust et Hoigné, 1990).

- Le maximum d'absorption du complexe $Fe(OH)_2^+$ ou $Fe(H_2O)_4(OH)_2^+$ se situe également à 297 nm avec un coefficient d'absorption molaire mal défini, compris entre 1100 $M^{-1}.cm^{-1}$ (Escot, 1973) et 1800 $M^{-1}.cm^{-1}$ (Knight et Sylva, 1975).

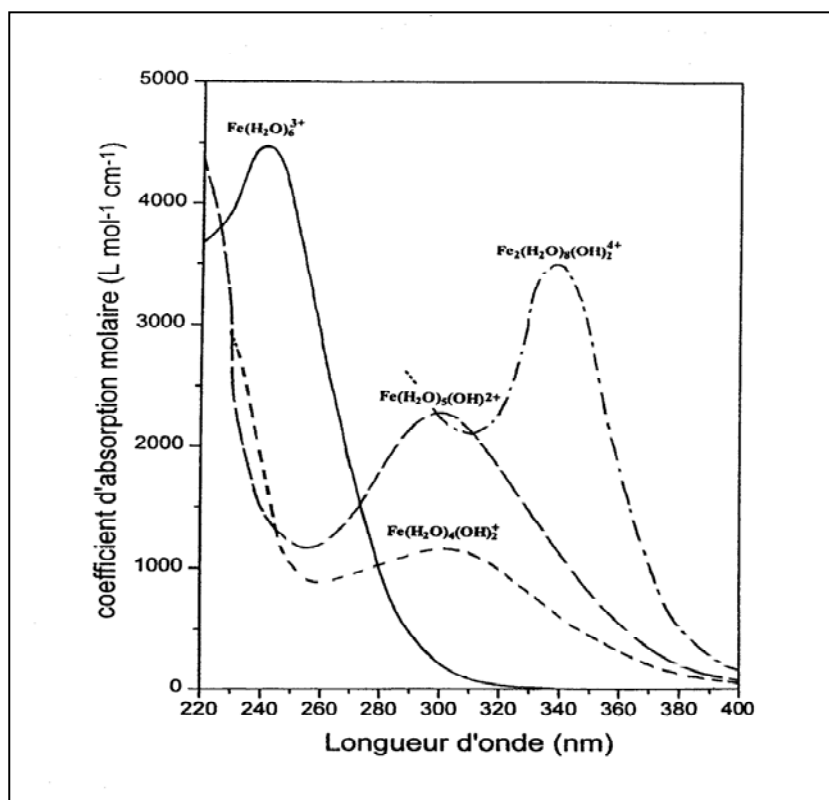


Figure II.31 : Spectres d'absorption UV-visible des complexes aqueux de fer(III)

- Le spectre d'absorption UV-visible du dimère $\text{Fe}_2(\text{OH})_2^{4+}$ ou $\text{Fe}_2(\text{H}_2\text{O})_8(\text{OH})_2^{4+}$ a un maximum à 335 nm avec un coefficient d'absorption molaire variant selon les auteurs de 3500 (Milburn, 1956) à $8300 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Knight et Sylva, 1975).

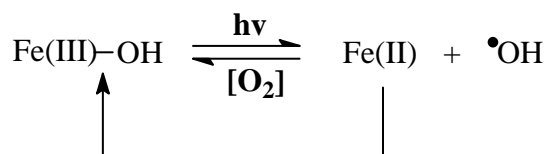
- Les agrégats solubles de fer(III) (ou colloïdes), espèces que l'on observe dans des solutions vieilles de fer(III) et de concentration inférieure à $5 \times 10^{-2} \text{ M}$, présentent une absorption continue et croissante de 500 à 200 nm. Il n'existe cependant pas de données plus précises sur leur caractérisation en spectrophotométrie UV-visible.

II.3.1.5 Comportement des complexes aqueux de fer(III) sous excitation lumineuse

En 1949, Evans et Uri (1949) ont été les premiers à montrer l'activité photochimique des sels ferriques. Ils ont mis en évidence dans une solution de FeCl_3 , la photopolymérisation de l'acrylonitrile et du méthacrylate de méthyle.

En 1953, Bates et Uri (1953) ont montré l'activité des ions ferriques sous la lumière UV. En effet l'irradiation des ions ferriques conduit à l'oxydation des composés organiques

en solution. L'agent responsable de cette réaction est supposé être le radical hydroxyle formé *via* la photodissociation de $\text{Fe}(\text{OH})^{2+}$.



Dans les vingt dernières années, le comportement photochimique des différents complexes aqueux du fer(III) a fait l'objet de nombreuses études. Différents auteurs se sont attachés à déterminer l'efficacité de cette réaction en évaluant les rendements quantiques de formation du fer(II) et des radicaux hydroxyle. D'autre part, ils ont également prouvé que l'efficacité de formation des radicaux hydroxyle dépendait des espèces de fer(III) présentes en solution aqueuse, de la longueur d'onde d'irradiation et du pH.

Lors de cette étape, les transitions de transfert de charge du ligand vers le métal (LMCT) sont impliquées ; elles sont caractéristiques des complexes de coordination dans lesquels on retrouve des ligands fixés sur un centre métallique. Sur la **Figure II.32** est représenté le diagramme énergétique qualitatif des orbitales moléculaires d'un complexe de métal de transition. Nous nous intéresserons plus particulièrement aux transitions nommées B.

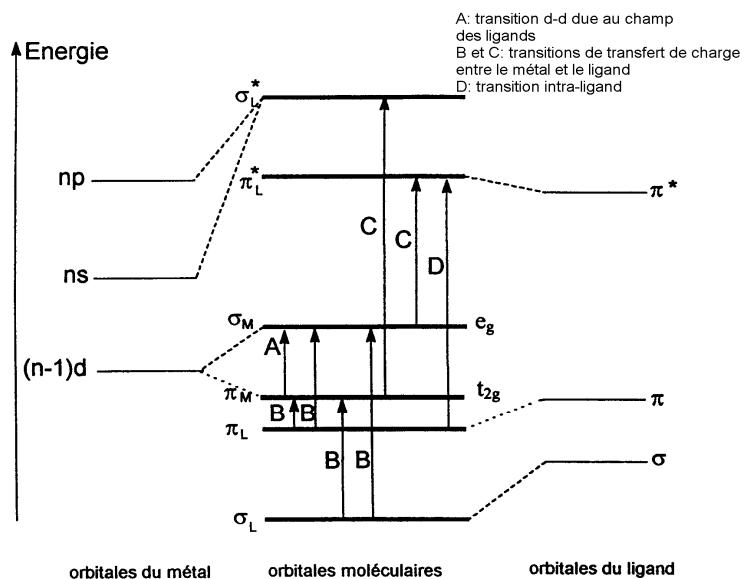
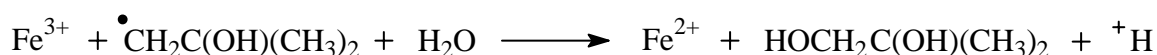


Figure II.32 : Diagramme énergétique d'un complexe de métal de transition.

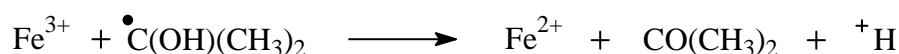
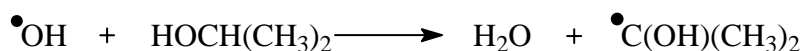
Lorsque l'on irradie un complexe métallique de transition (à une longueur suffisamment énergétique), l'énergie des photons peut être absorbée dans la bande à caractère de transfert de charge du ligand vers le métal et il va y avoir production d'un état excité. Dans

cet état excité (LMCT), le ligand et le métal sont potentiellement et respectivement oxydé et réduit. La désactivation de l'état excité peut ensuite avoir lieu soit par séparation des charges en libérant le ligand oxydé et le métal réduit, soit par un processus de désactivation radiative ou non, qui régénère le complexe initial.

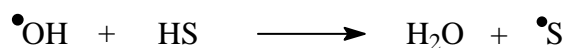
Différents auteurs ont irradié des solutions de fer(III) de concentrations variant entre 10^{-6} et 10^{-3} M en présence de capteur de radicaux $\bullet\text{OH}$, qui permettent de déterminer le rendement quantique de formation du $\bullet\text{OH}$. Par exemple Langford et Carey (1975) ont utilisé l'alcool *tert*-butylique comme capteur de radicaux $\bullet\text{OH}$ pour suivre la photoformation de $\bullet\text{OH}$ à partir de la photolyse directe de $\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$ et $\text{Fe}_2(\text{OH})_2^{4+}$. La réaction est la suivante :



Benkelberg et Warneck (1995) ont eux utilisés le 2-propanol au lieu de l'alcool *tert*-butylique comme capteur de radicaux $\bullet\text{OH}$ qui donne par la suite l'acétone.



En général, on peut résumer ces réactions de la manière suivante :



avec HS qui représente les capteurs des radicaux $\bullet\text{OH}$.

II.3.1.6 Les rendements quantiques de formation de $\bullet\text{OH}$ et fer(II)

Différents auteurs ont déterminé les rendements quantiques (rapport du nombre de molécules dégradées sur le nombre de photons absorbés dans le système) de formation du fer(II) et des $\bullet\text{OH}$ en irradiant des solutions de fer(III) contenant majoritairement l'espèce $\text{Fe}(\text{OH})^{2+}$. Ces rendements quantiques sont mesurés en utilisant différents capteurs de radicaux $\bullet\text{OH}$ (isopropanol, alcool *tert*-butylique,...) afin d'obtenir une mesure plus fiable et plus facile à réaliser. Les résultats obtenus sont consignés dans le **Tableau II.5** :

Solution du fer(III)	λ_{irr} (nm)	$\phi_{\bullet\text{OH}}$	$\phi_{\text{Fe(II)}}$	Référence
[Fe ³⁺] ₀ = 0,01 M [Acide benzoïque] = 2 mM [HClO ₄] = 0,02 M	365		0,067	Bates et Uri (1953)
[Fe ³⁺] ₀ = 0,0346 mM [HClO ₄] = 0,010 M en absence de benzène En présence de benzène	313		0,011 0,113	Baxendale et Magee (1955)
[Fe ³⁺] ₀ = 2,07 mM [HClO ₄] = 0,010 M [Méthanol] = 0,07 M	313		0,286	Baxendale et Magee (1955)
Fe(H ₂ O) ₆ ³⁺ Alcool <i>tert</i> -butylique	254	0,065	0,130	Langford et Carey (1975)
[Fe ³⁺] ₀ = 10,0 µM, pH= 4,0 [Alcool <i>tert</i> -butylique] = 200 µM	313 360	0,14 0,017		Faust et Hoigné (1990)
[Fe ³⁺] ₀ = 0,2 mM [Isopropanol] = 2mM, pH = 2~3	370 280	0,07 0,31		Benkelberg et Warneck (1995)

Tableau II.5 : Rendements quantiques de formation du fer(II) et des $\bullet\text{OH}$ dans différentes conditions.

Dans ce tableau, nous pouvons voir que le rendement quantique de formation de radicaux hydroxyle produits par photolyse de $\text{Fe}(\text{OH})^{2+}$, est dépendant de la longueur d'onde d'irradiation. Les radicaux $\bullet\text{OH}$ sont formés d'une façon plus efficace lorsque la longueur d'onde d'irradiation est plus courte, c'est-à-dire lorsque l'énergie des photons est plus grande. Ceci est en accord avec le fait que l'éjection des radicaux hydroxyle de la cage de solvant nécessite de l'énergie cinétique en plus de l'énergie demandée pour la transition électronique. Cet excès d'énergie va augmenter avec la diminution de la longueur d'onde d'excitation, ce qui a pour effet d'augmenter la production des radicaux hydroxyle (Faust et Hoigné, 1990 ; Benkelberg et Warneck, 1995). De la même manière, nous pouvons remarquer que les rendements quantiques de formation du fer(II) sont également dépendants de la longueur d'onde d'excitation. Ils sont plus importants lorsque la longueur d'onde d'irradiation est plus courte.

Comme nous l'avons déjà mentionné, l'efficacité de la formation des radicaux hydroxyle est fortement dépendante des espèces de fer(III) et de la longueur d'onde d'irradiation. Dans le **Tableau II.6**, nous avons répertorié quelques résultats d'études menées sur la formation de $\bullet\text{OH}$ lors de l'irradiation de solutions aqueuses de fer(III).

Solutions	λ irradiation(nm)	$\Phi_{\text{HO}\bullet}$	Référence
Fe^{3+}	254	0,065	Langford et Carey (1975)
	<300	$\approx 0,05$	Benkelberg et Warneck, (1995)
$\text{Fe}(\text{OH})_2^{2+}$	280	0,31	Benkelberg et Warneck, (1995)
	300	0,19	
	313	0,14	
	370	0,065	
$\text{Fe}(\text{OH})_2^{+}$	280	0,30	Benkelberg <i>et al.</i> , (1991)
	360	0,071	
$\text{Fe}_2(\text{OH})_2^{4+}$	350	0,007	Langford et Carey (1975)

Tableau II.6 : Rendements quantiques de formation des radicaux hydroxyle $\bullet\text{OH}$ pour différentes espèces de fer(III).

Dans ce tableau, nous pouvons voir que les complexes monomères $\text{Fe}(\text{OH})_2^{2+}$ et $\text{Fe}(\text{OH})_2^{+}$ sont les espèces les plus photoactives pour la formation des radicaux hydroxyle. Les deux autres espèces de fer(III) (Fe^{3+} , $\text{Fe}_2(\text{OH})_2^{4+}$) sont également des sources sous irradiation de radicaux hydroxyle mais ont des rendements quantiques beaucoup moins élevés pour une même longueur d'onde. Nous retrouvons l'effet de la longueur d'onde sur la formation des radicaux hydroxyle déjà mis en évidence d'après les résultats du **Tableau II.5**.

Dans le **Tableau II.7**, sont répertoriés quelques résultats d'études menées sur la mesure du rendement quantique de formation du fer(II) lors de l'irradiation de solutions aqueuses de fer(III).

	$\lambda_{\text{irradiation}}(\text{nm})$	$\Phi_{\text{Fe(II)}}$	Référence
$\text{Fe}_2(\text{H}_2\text{O})_8(\text{OH})_2^{4+}$	350	0,010 ^a	Knight et Sylva (1975)
$\text{Fe}(\text{OH})^{2+}$	313	0,14 ^b	Faust et Hoigné (1990)
	360	0,017 ^b	
$[\text{Fe}^{3+}]_0 = 1,0 \times 10^{-4} \text{ M}$	313	0,08 ^a	Mazellier <i>et al.</i> (1997a)
92% $\text{Fe}(\text{OH})^{2+}$	365	0,055 ^a	
$[\text{Fe}^{3+}]_0 = 1,0 \times 10^{-4} \text{ M}$	313	0,02 ^a	Mazellier <i>et al.</i> (1997a)
10% $\text{Fe}(\text{OH})^{2+}$	365	0,008 ^a	

^a en absence d'un piège à radicaux hydroxyle.

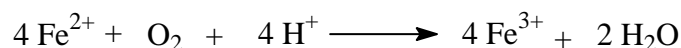
^b en présence d'un piège à radicaux hydroxyle (*t*-BuOH).

Tableau II.7 : Rendements quantiques de formation du fer(II) dans différentes conditions.

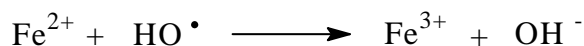
Nous pouvons voir que les rendements quantiques de formation du fer(II) sont de la même façon que pour ceux de production des radicaux hydroxyle, dépendant de la longueur d'onde d'irradiation et de la nature de l'espèce monomère de fer(III) présente en solution. L'espèce monomère $\text{Fe}(\text{OH})^{2+}$ est également l'espèce la plus photoactive en terme de formation du fer(II). En effet, sous irradiation à 313 nm, lorsque le pourcentage d'espèces monomères $\text{Fe}(\text{OH})^{2+}$, défini comme la concentration d'espèces monomères de fer divisée par la concentration de fer total en solution, diminue de 92 à 10%, le rendement quantique de formation de fer(II) diminue aussi de 0,08 à 0,02 (Mazellier *et al.*, 1997a).

$$\% \text{ d'espèce monomère} = \frac{[\text{Fe}(\text{OH})^{2+}]}{[\text{Fe}_{\text{total}}]} \times 100$$

Lors de l'irradiation à 313 nm des espèces monomères de $\text{Fe}(\text{OH})^{2+}$, Kawaguchi et Inagaki (1993) ont montré qu'en absence de pièges à radicaux hydroxyle, la vitesse de formation de fer(II) est constante puis diminue au bout d'une heure. Cette diminution a été attribuée à un processus de réoxydation thermique du fer(II) en fer(III) mettant en jeu l'oxygène dissous dans la solution selon l'équation globale suivante (Weiss, 1935):



Ce résultat peut être expliqué également par l'oxydation du fer(II) par les radicaux hydroxyle.



A travers ces résultats, nous constatons qu'en solution aqueuse, dans un domaine de pH compris entre 2,5 et 5,0, l'espèce majoritaire $\text{Fe}(\text{OH})^{2+}$ est également la plus photoactive. Par contre, pour des pH supérieurs à 5,0, la concentration de l'espèce $\text{Fe}(\text{OH})_2^+$ devient importante et nous observons la précipitation du fer plus ou moins rapidement suivant le pH, sous forme de trihydroxyde de fer ($\text{Fe}(\text{OH})_3$). Ce phénomène va ralentir fortement la production de radicaux hydroxyle.

II.3.2 Rôle du fer comme photoinducteur de la dégradation de polluants

De nombreuses études sur la dégradation photoinduite par des complexes aqueux de fer(III), de composés organiques n'absorbant pas ou peu la lumière solaire ($\lambda_{\text{abs}} \leq 300 \text{ nm}$) ont été développées.

Dans les années 1950, la capacité qu'ont les espèces monomères de fer(III) et plus particulièrement l'espèce $\text{Fe}(\text{OH})^{2+}$, à produire des radicaux très oxydants $\cdot\text{OH}$ ($E_0 = 2,80 \text{ eV}$) et non sélectifs, a été mise en évidence par Bates et Uri (1953) ainsi que par Baxendale et Magee (1955).

Cependant, le développement de cette approche a surtout connu son essor au cours des années 90, avec la mise au point des processus d'oxydation avancée (AOP's). De nombreux groupes de recherche ont mis l'accent sur la dégradation photochimique de systèmes contenant des complexes aqueux de fer(III). Ainsi, la dégradation en solution aqueuse sous irradiation artificielle (UV-visible), photoinduite par le fer ferrique, de très nombreux polluants organiques a été étudiée. On peut citer par exemple : le 2-chlorophénol (Kawaguchi et Inagaki, 1994), le 3-chlorophénol (Mazellier et Bolte, 2001), le 4-chlorophénol (Mazellier *et al.*, 1999) et le 2,6-diméthylphénol (DMP) (Mazellier *et al.*, 1997a) ; des herbicides de la famille des phénylurées, le diuron (3-(3,4-dichlorophényl)-1,1-diméthylurée) (Mazellier *et al.*, 1997b), l'asulam (4-amino-benzosulfonyl-méthylcarbamate) (Catastini *et al.*, 2002) et le monuron (Mestankova *et al.*, 2004) ; un plastifiant, le dibutylphtalate (DBP) (Bajt *et al.*, 2001) ; des agents tensioactifs, alkylphénols polyéthoxylés (Brand *et al.*, 1998) et l'acide benzoïque (Andreozzi et Marotta, 2004). Dans tous les cas cités ci-dessus, il faut noter que les molécules n'absorbent pas ou peu la lumière solaire ($\lambda \geq 300 \text{ nm}$) et donc ne subissent pas de photolyse directe. De plus, ces composés organiques n'ont pas d'interactions avec le fer ferrique à l'état fondamental.

Si l'on regarde de plus près le mécanisme de dégradation, on peut dire que seule l'étape primaire est identique pour l'ensemble des composés étudiés, étape correspondant à la formation du radical hydroxyle à partir du complexe aqueux de fer(III).

Par contre, la réaction de ce radical hydroxyle sur les composés organiques étudiés est fortement dépendante de leur structure chimique. En effet, une des conclusions importante tirée des nombreuses études réalisées au laboratoire de Photochimie Moléculaire et Macromoléculaire est de dire qu'il est très difficile de prévoir le devenir d'une famille de polluants subissant l'interaction «fer(III)-lumière solaire».

Pour illustrer ce phénomène, nous allons détailler un peu plus trois études particulières. Dans le cas du dibutylphthalate (DBP) (Bajt *et al.*, 2001), les auteurs ont mis en évidence une attaque du radical hydroxyle majoritairement sur la chaîne aliphatique. En effet, dans ce cas, les deux chaînes aliphatiques sont particulièrement sensibles à l'attaque par des radicaux hydroxyle, car premièrement elles possèdent chacune 9 atomes d'hydrogène susceptibles d'être arrachés par HO^\bullet , et deuxièmement, deux de ces atomes d'hydrogène sont beaucoup plus labiles car en position α de la fonction ester (**Figure II.33**) :

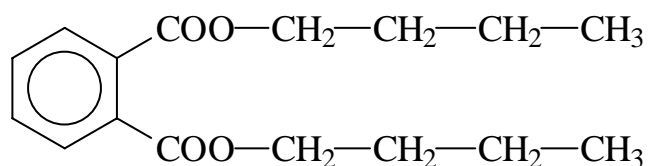


Figure II.33 : Structure du dibutylphthalate (DBP)

La dégradation initiée par l'attaque de radicaux hydroxyle formés par irradiation des complexes aqueux de fer(III) est schématisée de la manière suivante :

- Le radical R^\bullet formé peut alors soit réagir avec l'oxygène et former un radical RO_2^\bullet instable, soit avec le fer(III) pour donner un produit hydroxylé.
- Le radical RO_2^\bullet conduira à son tour à la formation du même produit hydroxylé, produit instable qui va rapidement se décomposer en dérivé carboxylique.

La **Figure II.34** représente la dégradation de DBP photoinduite par les sels ferriques en solution aqueuse. Il faut également souligner que pour des temps d'irradiation plus longs on arrive à la complète minéralisation du DBP de départ.

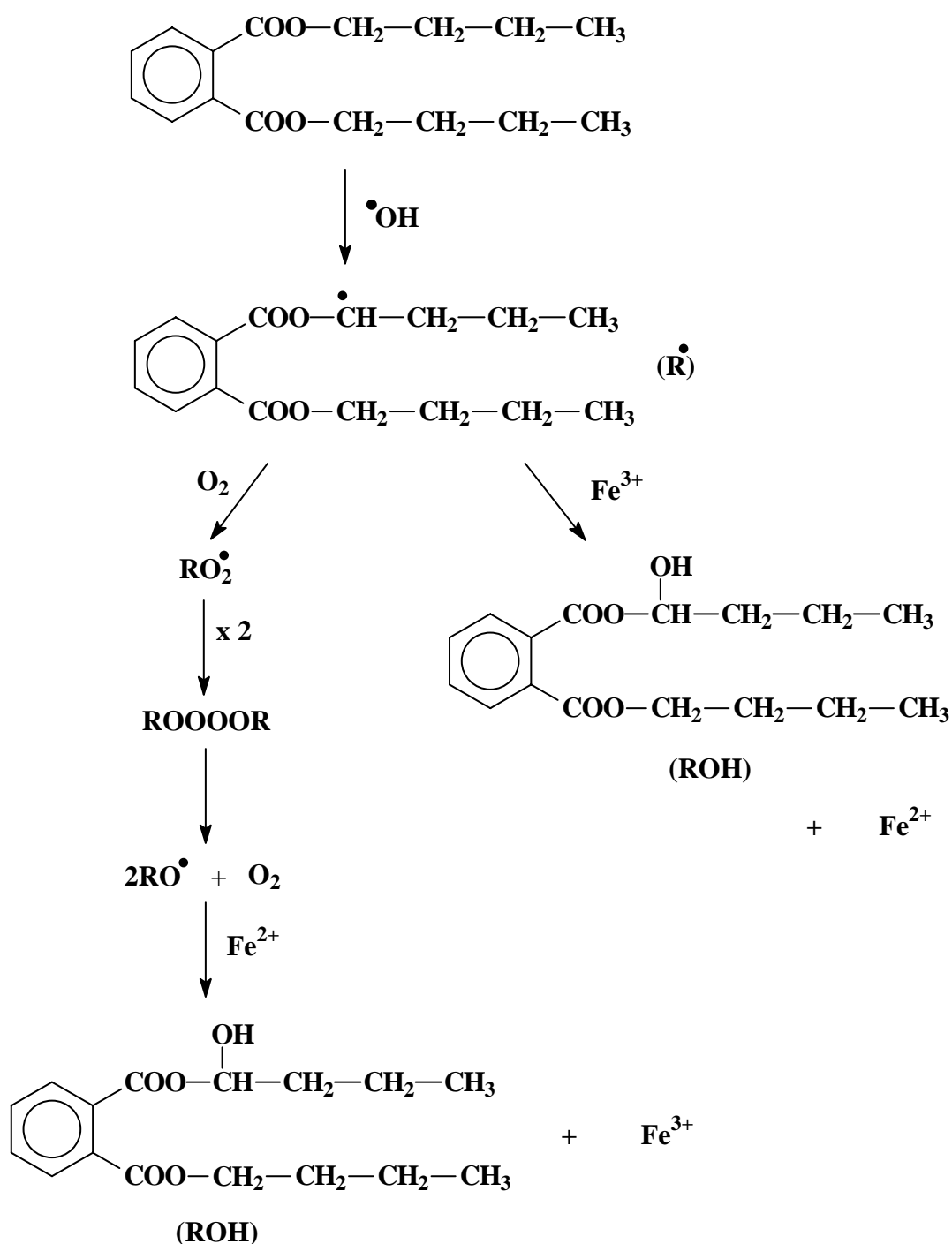


Figure II.34 : Mécanisme de dégradation du dibutylphthalate (DBP) par les radicaux $\bullet\text{OH}$.

Les radicaux hydroxyle peuvent également réagir de manière importante directement sur les noyaux aromatiques. Pour illustrer ce cas, nous présentons comme exemple la dégradation du 3-chlorophénol (3-CP) photoinduite par le fer ferrique (Mazellier et Bolte, 2001). En effet, les radicaux hydroxyle produits à partir de la photolyse de $\text{Fe}(\text{OH})^{2+}$, réagissent rapidement avec le 3-CP en formant un adduit radicalaire avec le cycle aromatique du 3-CP, le radical dihydroxychlorocyclohexadiényle (Stafford *et al.*, 1994). L'adduit

radicalaire évolue en présence de fer(III) et d'oxygène en conduisant à la formation de dérivés hydroxylés (chlorohydroquinone (I), 3-chlorocatéchol (III), 4-chlorocatéchol (IV), et chlorobenzoquinone (II)) (*Figure II.35*) :

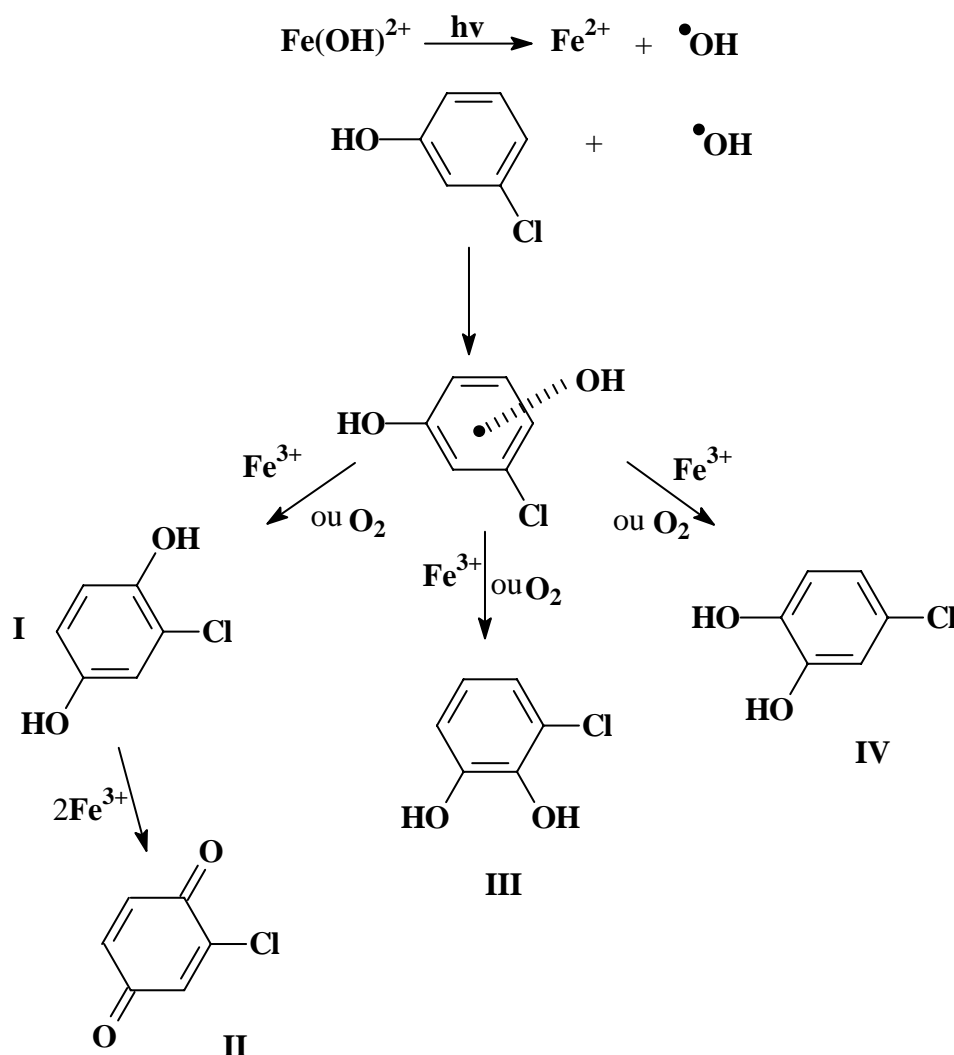


Figure II.35 : Mécanisme de dégradation du 3-chlorophénol par les radicaux $\bullet\text{OH}$.

Le dernier exemple montre l'intervention des radicaux hydroxyle à la fois sur la chaîne latérale branchée et sur le noyau aromatique. C'est le cas du diuron (Mazellier *et al.*, 1997b), où les produits identifiés montrent qu'il existe deux sites d'attaque préférentiels des radicaux $\bullet\text{OH}$ sur cette molécule. Ce sont les groupes méthyle de la fonction urée et le cycle aromatique (*Figure II.36*).

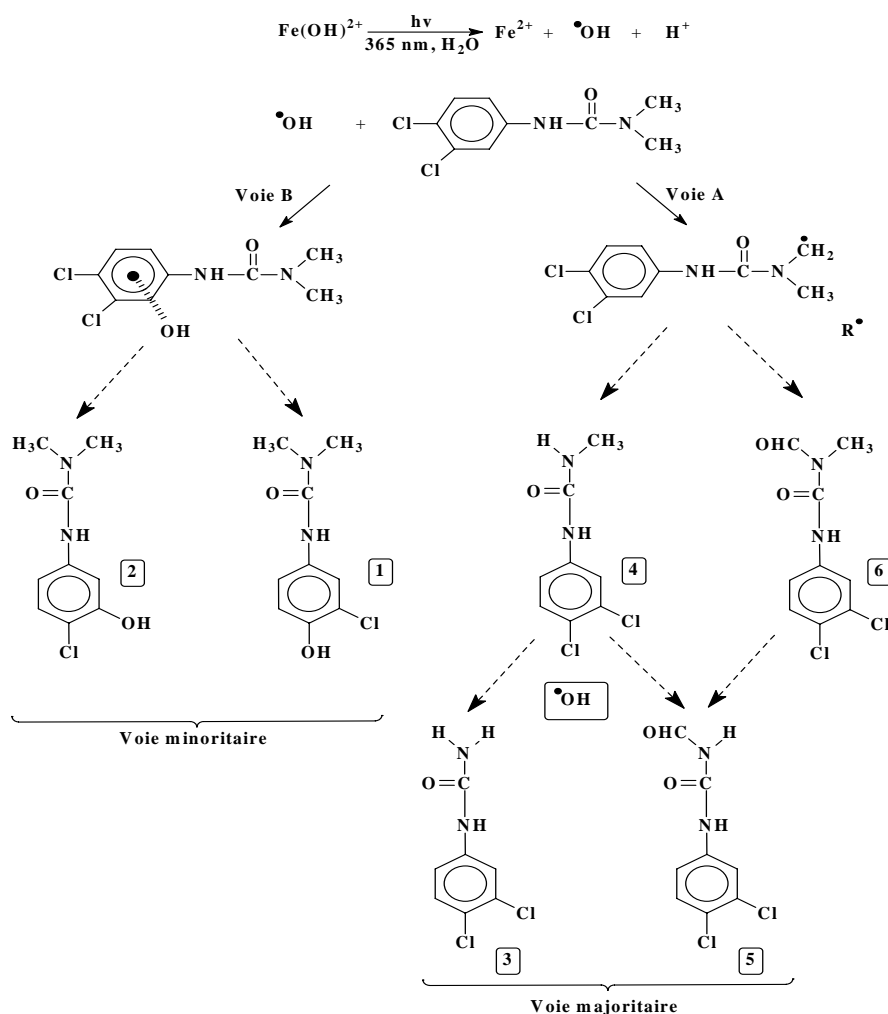


Figure II.36 : Mécanisme de dégradation du diuron par les radicaux $\bullet\text{OH}$.

Cependant grâce à la quantification des photoproduits identifiés, il est possible de dire que l'attaque des radicaux $\bullet\text{OH}$ a principalement lieu par arrachement d'un proton sur l'un des groupes méthyle de la fonction urée (Voie A). Le radical alkyle formé par l'arrachement d'hydrogène peut réagir avec l'oxygène pour former un radical peroxy ROO^\bullet , et après réarrangement conduire à la formation des deux photoproduits primaires 6 et 4. Par la suite, une nouvelle attaque des radicaux $\bullet\text{OH}$ sur les deux composés précédents (6 et 4) peut expliquer la formation des photoproduits secondaires (5 et 3).

La seconde voie (Voie B) de réaction des radicaux $\bullet\text{OH}$ passe par la formation d'un adduit radicalaire avec le cycle aromatique du diuron. Cet adduit conduit à la formation des dérivés hydroxylés sur le noyau aromatique (1 et 2).

II.3.3 Rôle du fer dans les processus enzymatiques de biodégradation : monooxygénases et dioxygénases

Une étude bibliographique sur la biodégradation de xénobiotiques permet de constater que la stratégie communément employée par les bactéries aérobies consiste en des réactions d'oxydation qui ont pour effet d'accroître le caractère hydrophile du polluant et de faciliter leur excrétion ultérieure. Parmi ces transformations, on trouve notamment des réactions d'hydroxylation, dans lesquelles un ou deux atomes d'oxygène sont introduits dans le substrat à partir de l'oxygène moléculaire de l'air. Ce type de réactions est catalysé soit par des monooxygénases, soit par différents types de dioxygénase (Pelmont, 1993 ; Nozaki, 1979 ; Bertini *et al.*, 1996). Ces enzymes sont d'un intérêt très particulier pour nos études car, comme nous l'avons décrit plus haut, elles sont impliquées dans la biodégradation des dérivés du benzothiazole.

Le point commun à toutes les réactions catalysées par ces systèmes enzymatiques complexes est la présence de fer au sein de ces protéines, qui joue alors un rôle majeur, comme dans le cas des processus photochimiques, dans la génération d'espèces radicalaires et oxydantes.

Globalement le Fer est coordonné selon trois modes majeurs :

➤ *Dans des structures hémiques*

Un exemple de structure hémique est présenté dans la **Figure II.37** : le fer est coordonné aux quatre atomes d'azote du cycle porphyrique.

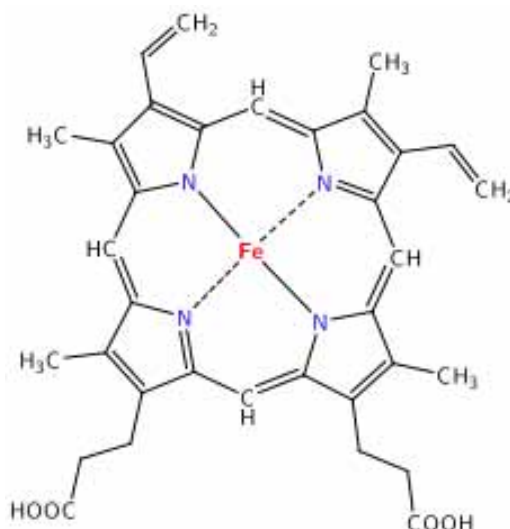


Figure II. 37 : Structure hémique de type B

Selon la nature des chaînes latérales de ce cycle permettant la liaison du fer au reste de la protéine, les groupements Hèmes sont appelés Hème A, B, C, etc. Le groupe Hème B est le plus fréquent.

➤ *Dans des clusters [2Fe-2S]*

Les deux atomes de fer sont coordonnés aux deux atomes de soufre au sein du cluster. Le cluster est relié au reste de la protéine *via* les coordinations d'un atome de fer avec deux atomes de soufre de deux cystéines et de l'autre avec deux atomes d'azote de deux histidines. Un type particulier de cluster, noté [2Fe-2S]_R est appelé centre Fer–Soufre de Rieske (**Figure II.38**). Les ligands coordonnant le cluster viennent de deux boucles, chaque boucle contenant une cystéine et une histidine, les séquences d'acides aminés consensus de ces boucles sont du type Cys-Xaa-His-(Xaa)₁₅₋₁₇-Cys-Xaa-His.

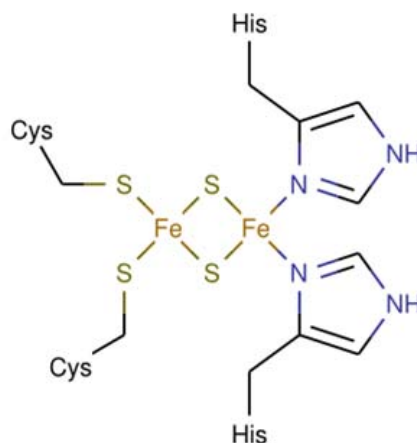


Figure II.38 : Centre Fer-Soufre de Rieske (cluster [2Fe-2S]_R)

➤ *En tant que Fe(II) ou Fe(III)*

Dans certains cas, le Fer n'est pas engagé dans des structures de type hémique ou cluster [2Fe-2S] mais intervient sous forme de Fe (II) ou Fe (III) coordonné à des acides aminés de la protéine (par exemple quatre histidines, ou Histidine/Tyrosine). Certaines dioxygénases contiennent à la fois un cluster [2Fe-2S] et un Fe (II) sur un autre site, d'autres possèdent seulement du Fe(III) ou du Fe(II) sans autres structures.

Dans la suite du document, nous allons détailler les mécanismes d'action des mono- et dioxygénases contenant ces différentes formes du fer.

II.3.3.1 Les monooxygénases

La réaction catalysée par une monooxygénase est la suivante :



L'unique atome d'oxygène introduit sur le substrat apparaît sous la forme d'un hydroxyle. Cette réaction nécessite toujours une source d'électrons qui est constituée généralement par le NADH ou NADPH.

L'oxygène diatomique étant une molécule stable assez peu réactive, s'en servir comme donneur d'un atome d'oxygène pour venir l'insérer dans une molécule organique nécessite l'intervention d'un mécanisme enzymatique approprié. De manière générale, la molécule de O_2 est réduite en se fixant à l'enzyme sous la forme d'un peroxyde. Sa rupture hétérolytique engendre une molécule d'eau et un dérivé oxygéné très réactif de l'enzyme qui a pour effet d'apporter un atome d'oxygène sur le substrat. Les enzymes qui catalysent ce type de transformations sont les cytochromes P450 et les monooxygénases flaviniques.

Les cytochromes P450

Les cytochromes P450 sont des monooxygénases héminiques. Ils sont répartis en quatre classes (Roberts *et al.*, 2002) selon la nature des protéines auxiliaires (transporteurs d'électrons) qui leur permettent de fonctionner (**Figure II.39**) :

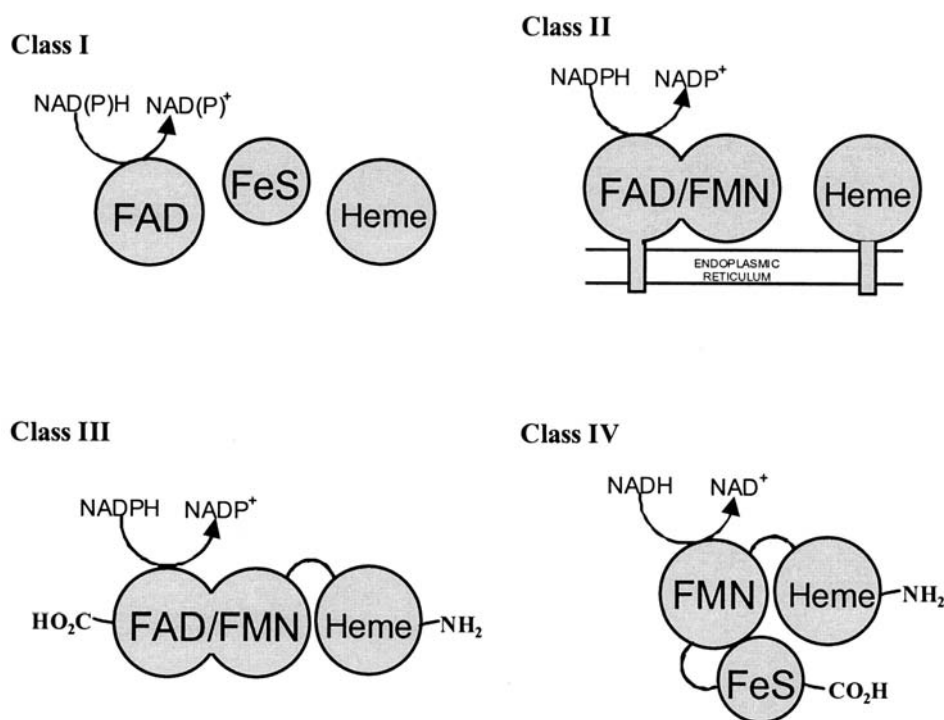


Figure II.39 : Classification des cytochromes P450 (d'après Roberts *et al.*, 2002).

Les cytochromes P450 de classe I, qui ont été identifiés dans les membranes de mitochondries et dans les bactéries, sont constitués de 3 composantes comprenant une flavine-réductase, une ferrédoxine contenant un centre Fer-Soufre et la protéine hémique du P450. Les cytochromes P450 de classe II sont constitués de deux composantes : une réductase diflavinique à FAD et à FMN fonctionnant avec du NADPH et une protéine hémique. Ces systèmes sont typiques des enzymes microsomales des cellules de mammifères impliquées dans le métabolisme des stéroïdes et dans les voies de détoxification. Parmi les cytochromes P450 d'origine bactérienne, une ω -hydroxylase a été découverte chez *Bacillus megaterium*, et nommée P450_{BM3}. Sa structure ne diffère des cytochromes eucaryotes de classe II que par la présence d'un lien peptidique qui unit les deux composantes, conduisant à un polypeptide unique. En raison d'une structure primaire différente de celle des cytochromes de classe II, elle a été considérée comme le premier exemple de cytochrome P450 de classe III. Par la suite, d'autres enzymes sont venues compléter cette liste (CYP 102 A2 et CYP 102 A3 de *Bacillus subtilis*). Plus récemment, Roberts *et al.* (2002) ont isolé un nouveau type de cytochrome P450 chez *Rhodococcus* sp. NCIMB 9784, le P450RhF qui est constitué d'un P450 fusionné à une dioxygénase à activité réductase. Douée d'une organisation structurale particulière, cette enzyme a été considérée comme appartenant à une nouvelle classe de cytochrome P450, la classe IV. Dans cette nouvelle classe d'enzyme, les électrons sont acheminés vers le site actif du P450 par un centre FMN et un composant de type ferrédoxine [2Fe-2S].

Le cytochrome P450 le plus connu est le P450_{cam} (classe I) isolé de la souche *Pseudomonas putida* qui catalyse l'hydroxylation du (+)-(1R)-camphre en 5-*exo*-hydroxy-camphre de manière stéréo et régiospécifique. Sa structure tridimensionnelle a été la première à être déterminée par diffraction des rayons X dans sa forme libre et liée avec le substrat (Poulos *et al.*, 1987). La **Figure II.40** présente la modélisation de la structure 3D du cytochrome P450_{cam} de *Pseudomonas putida* complexé au (1S)-camphre (Schlichting *et al.*, 1997). L'atome de fer est bien visible (en gris) au centre de la structure.



Figure II.40 : Structure 3D du cytochrome P450cam de *Pseudomonas putida* complexé au (1S)-camphre (d'après Schlichting et al., 1997).

Le fonctionnement de ce cytochrome nécessite une source d'électrons qui est le NADH. Etant incapable d'utiliser ce cofacteur par lui-même, il reçoit les électrons du NADH par l'intermédiaire d'une mini-chaîne de transporteurs d'électrons constituée de deux protéines (une putidarédoxine et une enzyme flavinique fonctionnant à la manière d'une déshydrogénase) appelée putidarédoxine-réductase. L'organisation du complexe protéinique est représentée de la manière suivante (**Figure II.41**) :

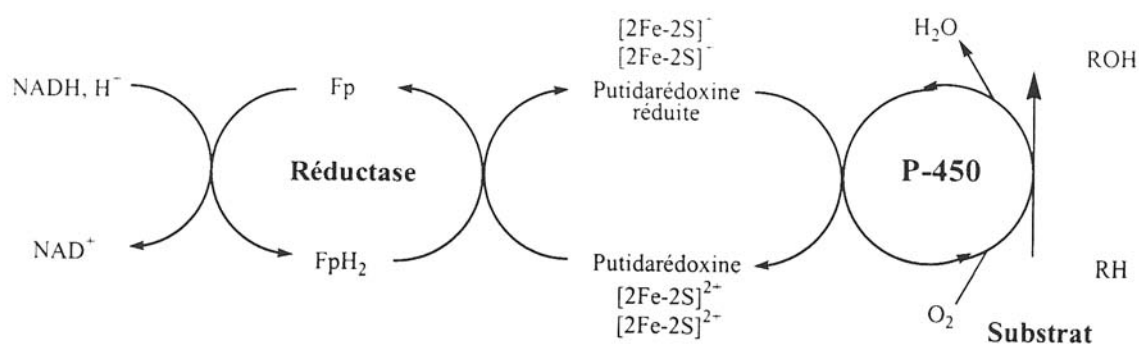


Figure II.41 : Chaîne de transfert des électrons dans le cas du P450_{cam} de *Pseudomonas putida* (d'après Pelmont, 1993).

Cette ferrédoxine récupère les deux électrons du NADH séparément sur chacun de ses deux centres [2Fe-2S]. Ces électrons sont ensuite livrés l'un après l'autre au P450 comme indiqué dans la **Figure II.42** qui décrit le cycle catalytique de cette enzyme.

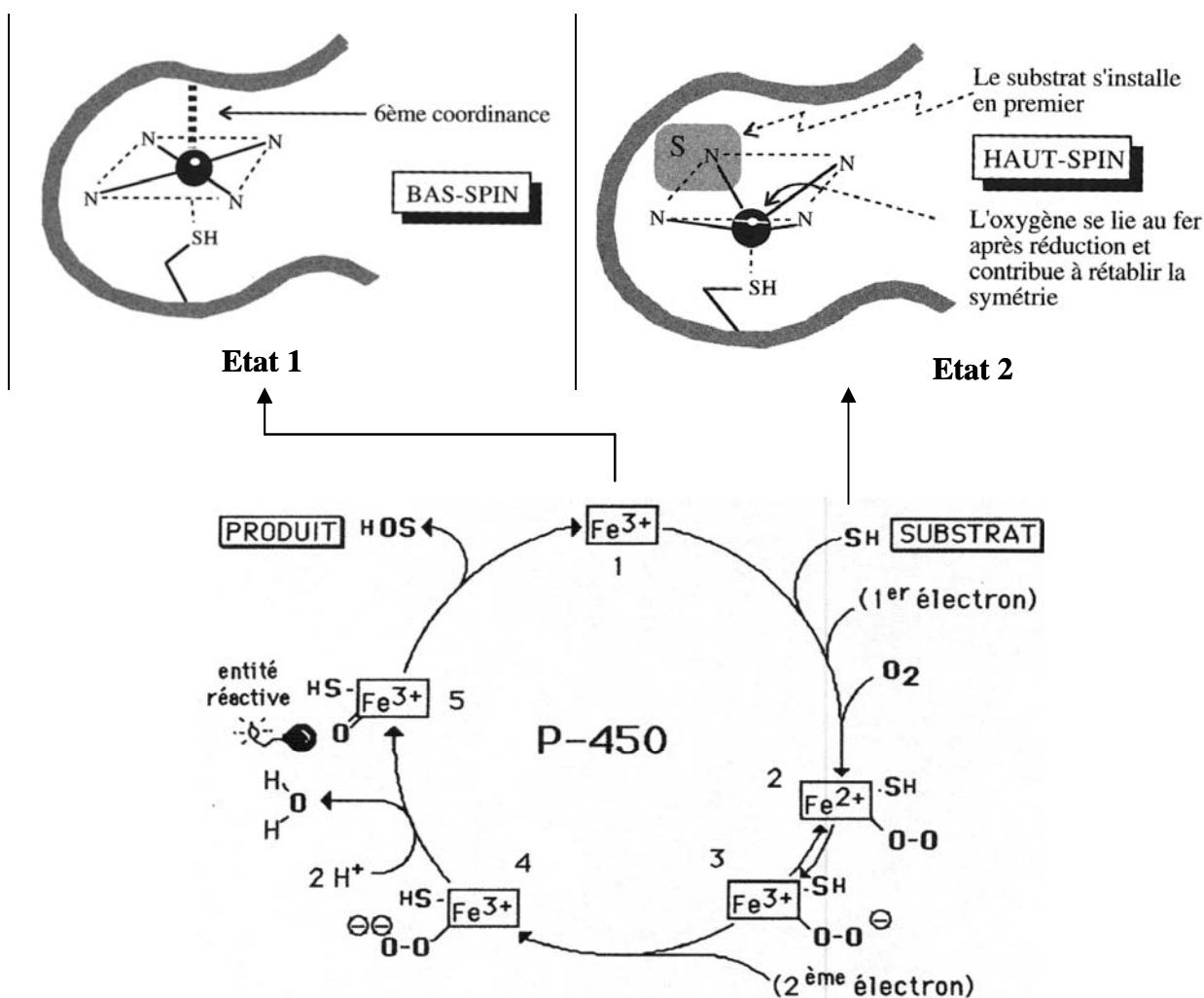


Figure II.42 : Cycle catalytique du cytochrome P450 (d'après Pelmont, 1993).

Avant l'arrivée du substrat, le fer contracte six coordinences dont quatre avec les groupes donneurs de la porphyrine et deux dans une direction perpendiculaire, l'une avec la fonction thiol d'un résidu cystéine du site actif, l'autre avec une molécule d'eau (état 1). La géométrie de coordination est alors parfaite autour du fer qui se trouve dans un état de bas spin ($S = 1/2$) et possède un potentiel d'oxydoréduction de -300 mV. L'arrivée du substrat (SH) vient rompre cet équilibre en chassant la molécule d'eau sans la remplacer, ce qui entraîne une délocalisation du fer par rapport au plan de la porphyrine et laisse un vide qu'une molécule d'oxygène viendra occuper (état 2). Ce déséquilibre place le fer dans un état de haut spin ($S = 5/2$) et fait remonter son potentiel à -173 mV, favorable à la réduction de l'enzyme par la putidarédoxine, dont le potentiel est de -196 mV. La réduction du fer permet alors la liaison de l'oxygène qui vient s'installer en sixième position (états n° 2, n° 3 du cycle catalytique). Si l'on considère que l'entité $(\text{FeO}_2)^{2+}$ est un oxydant faible, l'arrivée du

deuxième électron pour former l'entité **4** est indispensable afin que la scission de la liaison O-O puisse se réaliser et conduire à l'entité réactive **5** (oxygène activé). Le stade réactif n° **5** ainsi que l'étape de sa genèse (coupure de la liaison O-O) sont mal connus. Cette dernière peut s'effectuer par scission homo- ou hétérolytique.

Une coupure homolytique générerait l'espèce $(\text{FeO})^{2+}$ et le radical OH^\bullet . Celui-ci arracherait un atome d'hydrogène du substrat pour former une molécule d'eau et un radical R^\bullet qui réagirait avec $(\text{FeO})^{2+}$ pour être hydroxylé, après neutralisation des charges intermédiaires par un proton.

Une coupure hétérolytique conduirait à la formation de $(\text{FeO})^{3+}$ et d'un ion OH^- qui se recombinerait avec un proton pour donner une molécule d'eau (**Figure II.42**). Le complexe $(\text{FeO})^{3+}$ arracherait ensuite un atome d'hydrogène du substrat pour former un radical R^\bullet et l'entité $(\text{FeOH})^{3+}$. Ces deux entités réagissent alors entre elles pour donner le produit oxydé (Koymans *et al.*, 1993).

Un exemple de structure 3D de ferrédoxine contenant un cluster $[2\text{Fe-2S}]$ (au centre) est présenté dans la **Figure II.43** (Binda *et al.*, 1998).



Figure II.43 : Structure 3D d'une ferrédoxine d'épinard contenant un cluster $[2\text{Fe-2S}]$ (d'après Binda *et al.*, 1998).

Les monooxygénases flaviniques

Bien que cette classe d'enzyme ne contienne pas d'atome de fer, nous avons souhaité décrire ces systèmes qui conduisent aux mêmes métabolites que les autres monooxygénases. Contrairement aux cytochromes P450, ces monooxygénases à FAD fonctionnent sans

l'intervention d'autres protéines et utilisent directement la source d'électrons qui est toujours le NADH ou le NADPH. Les représentants les mieux connus du groupe sont la *p*-hydroxybenzoate hydroxylase et la salicylate hydroxylase observées chez plusieurs genres bactériens comme *Pseudomonas*, *Azotobacter* et *Acinetobacter*. Ces enzymes catalysent respectivement, la conversion du *p*-hydroxybenzoate en protocatéchuate (acide 3,4-dihydroxybenzoïque) et du salicylate (*o*-hydroxybenzoate) en catéchol (Pelmont, 1993).

Ces enzymes ont fait l'objet de nombreuses études chez les mammifères. Elles sont présentes dans de nombreux tissus et existent sous de multiples isoformes. Spécialisées dans l'oxydation de xénobiotiques notamment soufrés ou azotés, elles se caractérisent par une spécificité de substrats exceptionnellement large, propriété qui est due à leur cycle catalytique particulier (**Figure II.44**).

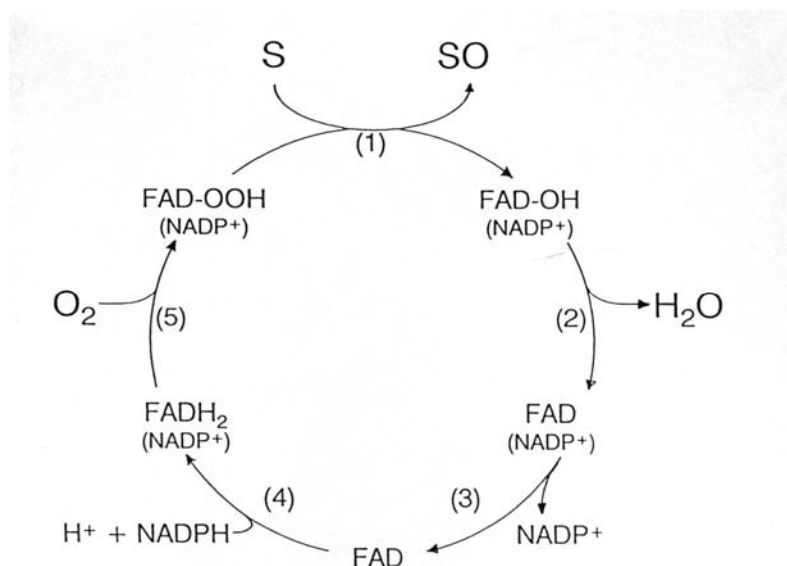


Figure II.44 : Cycle catalytique des monooxygénases flaviniques (d'après Ziegler, 1993).

Dans la cellule, cette protéine est apparemment présente sous une forme hydroperoxyde (hydroxyperoxyflavine FAD-OOH) très réactive, formée par une liaison covalente entre la flavine et l'oxygène susceptible d'oxyder n'importe quel composé qui entre en contact avec elle (étape n° 1). Le produit (SO) formé par le transfert de l'oxygène de l'hydroperoxyflavine au substrat, est relargué immédiatement. L'oxygène résiduel généré par la scission du peroxyde est libéré sous forme d'une molécule d'eau (étape n° 2), puis l'enzyme se détache du NADP (étape n° 3) afin de pouvoir accueillir un nouveau cofacteur chargé en électrons (étape n° 4). Une nouvelle molécule d'oxygène va ainsi être activée (réduction par le NADPH) sous forme d'un nouvel hydroperoxyde (étape n° 5). Le substrat

n'est pas requis pour que les étapes 2 à 5 se réalisent. Un seul point de contact est nécessaire pour la formation du produit, propriété qui est à l'origine de leur large spécificité de substrats.

II.3.3.2 Les dioxygénases

Les dioxygénases sont classées en deux catégories en fonction du type de réaction qu'elles catalysent (Bertini *et al.*, 1996). La première catégorie de dioxygénases (type I) incorpore deux groupements hydroxyle en position *ortho* l'un de l'autre dans le cycle aromatique du substrat en utilisant le NAD(P)H comme donneur d'électrons, c'est le cas de la benzène dioxygénase (**Figure II.45**).

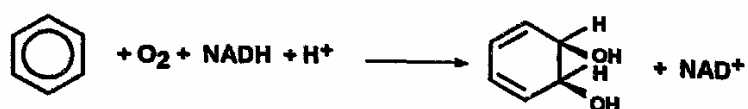


Figure II.45 : Réaction catalysée par une dioxygénase de type I.

Le *cis*-dihydrodiol obtenu est ensuite converti en catéchol par une déshydrogénase. Cet intermédiaire est alors pris en charge par une deuxième catégorie de dioxygénases (type II) qui ouvrent les cycles aromatiques en incorporant deux atomes d'oxygène à des endroits bien spécifiques du substrat, les catéchol 1,2-dioxygénases (coupure intradiol) et les catéchol 2,3-dioxygénases (coupure extradiol) (**Figure II.46**) :

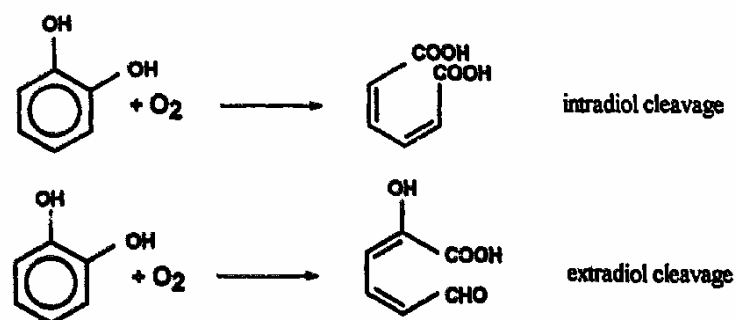


Figure II.46 : Réactions catalysées par les dioxygénases de type II ; Catéchol 1,2-dioxygénase (en haut) et catéchol 2,3-dioxygénase (en bas).

Dioxygénases de type I

Appelées aussi dioxygénases hydroxylantes, elles font partie d'un consortium de deux ou trois protéines pour former une chaîne de transporteurs d'électrons, qui transfère les électrons du NADH à une dioxygénase terminale. Les dioxygénases hydroxylantes sont réparties en trois grandes classes (**Figure II.47**).

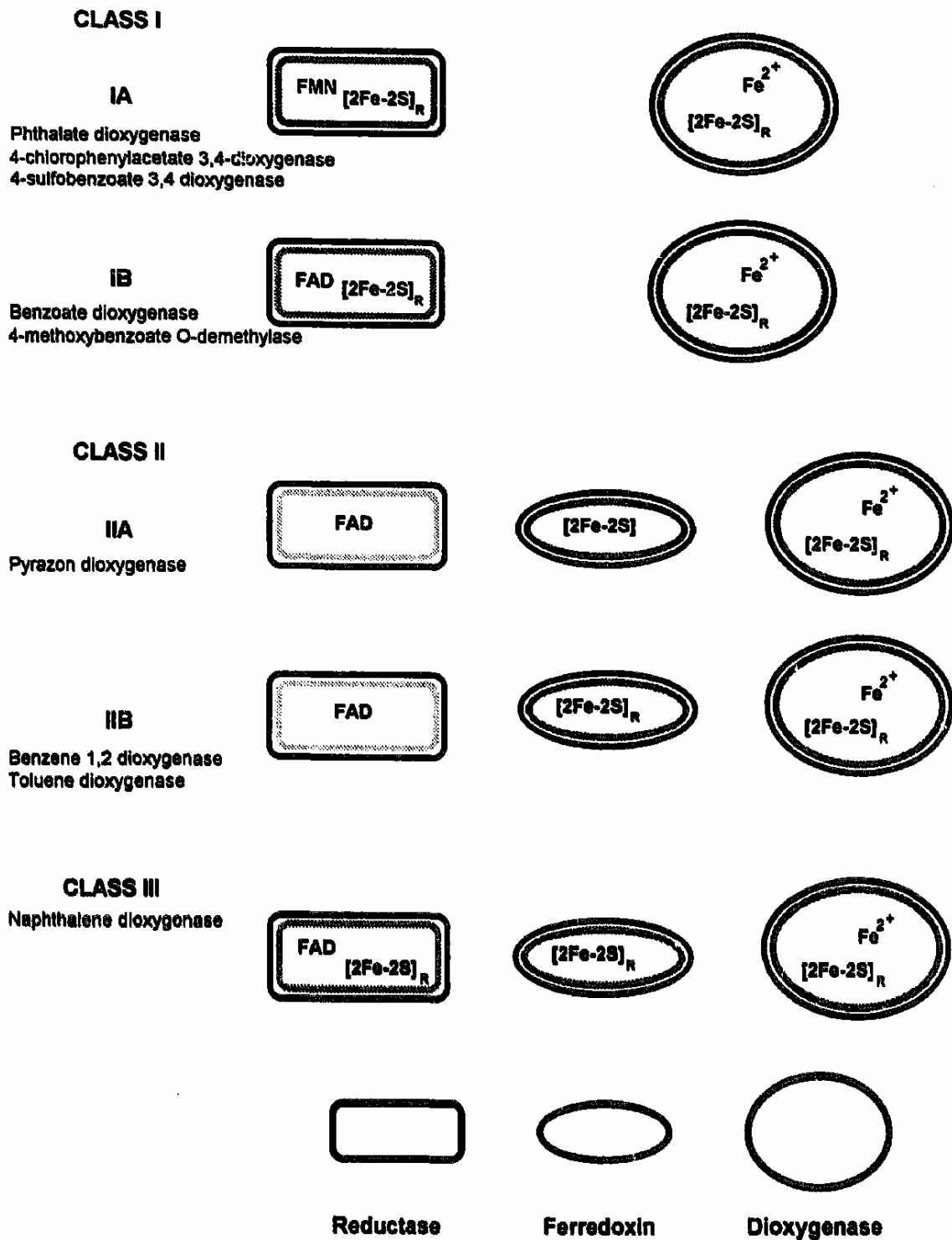


Figure II.47 : Classification des dioxygénases de type I. $[2Fe-2S]_R$ indique que le fer est complexé selon le type "Rieske" (d'après Bertini et al., 1996).

Dans la première classe, la chaîne de transporteurs d'électrons est constituée de deux protéines, une réductase à flavine (FAD ou FMN) contenant un groupe $[2\text{Fe-2S}]_R$, et une oxygénase.

La deuxième classe comporte trois protéines : une réductase uniquement à flavine, une ferrédoxine qui possède un centre $[2\text{Fe-2S}]$, et une oxygénase terminale. Les dioxygénases de classe II sont réparties en deux catégories selon que le centre $[2\text{Fe-2S}]$ est de type "Rieske" ou non.

La classe III est également formée de trois protéines : une réductase à flavine, une ferrédoxine et une oxygénase terminale possédant un centre $[2\text{Fe-2S}]_R$.

L'exemple de la chaîne de transporteurs d'électrons de la benzène 1,2-dioxygénase (classe IIB) est représentée *Figure II.48*.

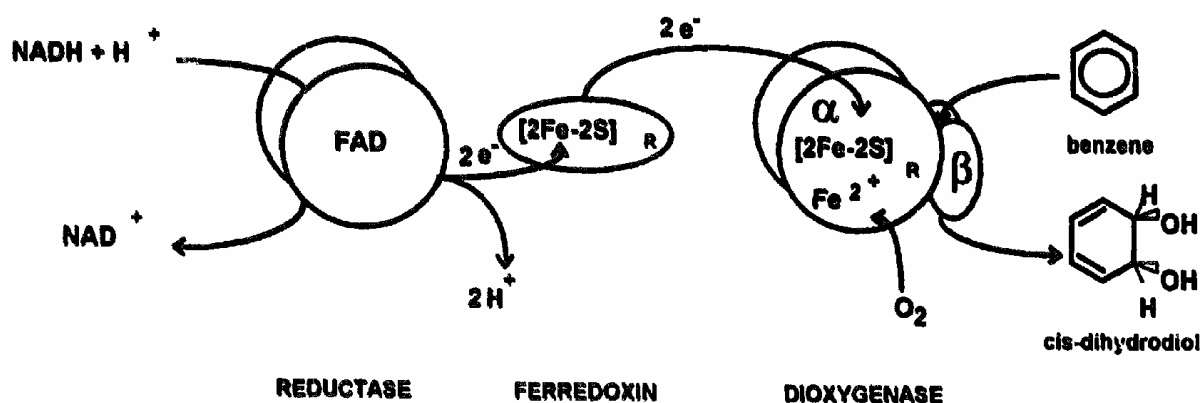


Figure II.48 : Chaîne de transfert d'électrons pour la benzène 1,2-dioxygénase. $[2\text{Fe-2S}]_R$ indique que le fer est complexé selon le type "Rieske" (d'après Bertini et al., 1996).

La première étape dans la chaîne de transporteurs d'électrons est une réduction du cofacteur FAD ou FMN de la réductase grâce au NAD(P)H. Les flavoprotéines des oxygénases de classes I et les ferrédoxines des oxygénases de classes II et III assurent le transfert d'électrons vers l'oxygénase terminale. Cette dernière est responsable de l'insertion des deux atomes d'oxygène sur les substrats aromatiques.

Ces dioxygénases sont de grosses protéines de poids moléculaire allant de 150 à 200 kDa, formées par l'assemblage de 2 à 6 sous-unités de type α et β . Ces sous-unités s'organisent soit de manière homotypique pour former des dimères α_2 , des trimères α_3 ou des tétramères α_4 , soit de manière hétérotypique pour former des tétramères $\alpha_2\beta_2$ ou des hexamères $\alpha_3\beta_3$.

Les sous-unités α contiennent le centre $[2\text{Fe-2S}]$ qui accepte les électrons de la ferrédoxine et assure l'activité catalytique de l'enzyme, alors que la sous-unité β semble

impliquée dans la reconnaissance du substrat, qui confère ainsi la spécificité de l'enzyme. La présence de l'ion fer est essentielle pour l'activité catalytique. La comparaison des séquences d'acides aminés de différentes oxygénases montre que deux résidus histidine et deux résidus tyrosine sont conservés et seraient donc impliqués comme ligands du fer au sein du site actif, où l'oxygène viendrait réagir. Le complexe fer³⁺-peroxo ainsi formé réagirait ensuite avec le substrat (Bertini *et al.*, 1996).

Le dihydrodiol formé est ensuite réaromatisé par une déshydrogénase pour conduire au catéchol. Le cycle aromatique de ce composé est alors clivé par les dioxygénases de type II.

Dioxygénases de type II

Comme nous l'avons vu précédemment, les catéchol 1,2-dioxygénases et les catéchol 2,3-dioxygénases sont des protéines qui catalysent l'addition des deux atomes de l'oxygène moléculaire sur un catéchol avec clivage du cycle aromatique. Ces enzymes contiennent du fer non hémunique dans un état d'oxydation bien particulier, ce qui fait que leur structure et leur fonctionnement sont assez différents.

Par ailleurs, le mécanisme d'action des catéchol dioxygénases est différent de celui des monooxygénases. Au lieu d'augmenter la réactivité de l'oxygène diatomique de l'air, ces enzymes déstabilisent le substrat de façon à le rendre très susceptible vis-à-vis de l'oxygène.

Fonctionnement des catéchol 1,2-dioxygénases

Les catéchol 1,2-dioxygénases qui catalysent l'ouverture des cycles aromatiques sont des protéines dimériques constituées de sous-unités α et/ou β de masse moléculaire de 30,5 à 34 kDa, contenant un nombre varié d'atomes de fer par mole d'enzyme. Il semble que ces protéines soient des isozymes, c'est-à-dire des enzymes qui coexistent à la fois sous forme homodimériques ($\alpha\alpha$, $\beta\beta$) et hétérodimériques ($\alpha\beta$) et qui possèdent la même activité catalytique vis-à-vis d'un substrat. Ces protéines résulteraient des trois combinaisons possibles des sous-unités α et β en dimère pour former des homodimères $\alpha\alpha$, $\beta\beta$ et des hétérodimères $\alpha\beta$ (Stratchan *et al.*, 1998).

Les catéchol 1,2-dioxygénases ont été classées en trois familles principales selon leur spécificité de substrat : les catéchol 1,2-dioxygénases, les chlorocatéchol 1,2-dioxygénases et les protocatéchuates 3,4-dioxygénases. Les deux premières catalysent l'oxygénation 1,2 des catéchols et de certains de leurs dérivés mais ne transforment pas le protocatéchuate (3,4-dihydroxybenzoate), alors que la protocatéchuate 3,4-dioxygénase transforme le

protocatéchuate mais n'admet pas les catéchols. Les catéchol 1,2-dioxygénases peuvent aussi catalyser le clivage 2,3 de substrats substitués en position *mé*ta tels que le 3-méthylcatéchol ou le 3-méthoxycatéchol. En revanche, les chlorocatéchol 1,2-dioxygénases n'en sont pas capables (Nakai *et al.*, 1990).

Dans chaque paire $\alpha\beta$, le fer III est coordonné par deux tyrosines et deux histidines appartenant aux chaînes β . Une cinquième liaison est formée avec une molécule d'eau. Il en résulte une géométrie de type bipyramide trigonale autour du fer. Cependant, celui-ci cherche à capter absolument un sixième ligand pour acquérir son état de coordination le plus favorable, (hexacoordiné pour former une géométrie octaédrique). L'arrivée du substrat expulse la molécule d'eau et implique la rupture de la liaison axiale avec l'histidine (**Figure II.49**).

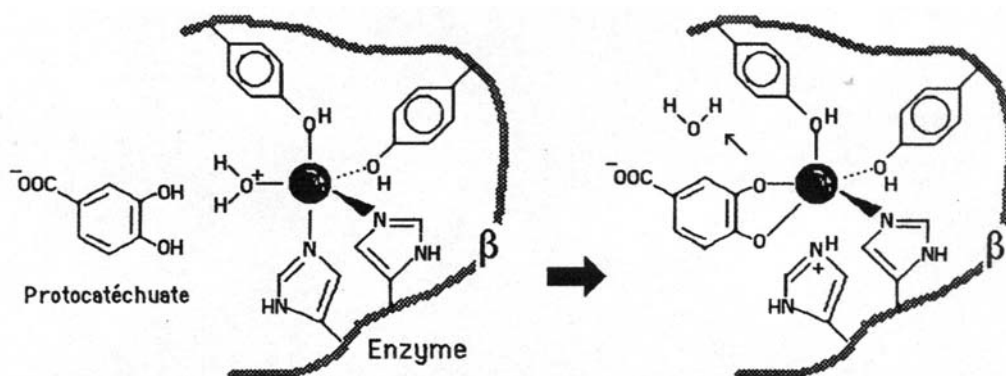


Figure II.49 : Fixation du substrat dans le site actif de la catéchol 1,2-dioxygénase (d'après Pelmont, 1993).

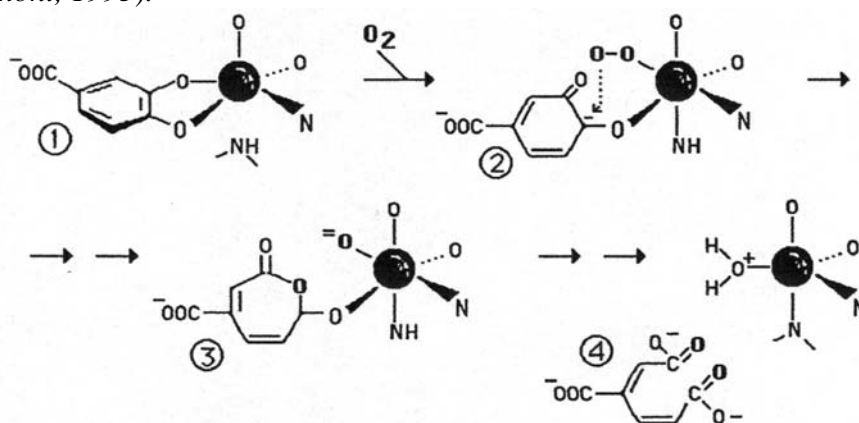


Figure II.50 : Mécanisme d'ouverture de cycle par une catéchol 1,2-dioxygénase (d'après Pelmont, 1993).

Une fois le substrat doublement lié au fer, l'oxygène s'installe dans le site actif en se liant au fer pour former un peroxyde (état $n^\circ = 2$, **Figure II.50**). Le substrat subit ensuite une

cétonisation pour former une structure qui le rend très oxydable. L'attaque par l'oxygène qui s'ensuit entraîne la rupture du cycle (états $n^\circ = \underline{3}$ et $\underline{4}$) (Pelmont, 1993).

Dorn et Knackmuss (1978) ont étudié l'influence de la présence d'un substituant halogéné (chlore) et méthylé en position 3 et 4 sur la 1,2-dioxygénation de catéchols par différentes catéchol 1,2-dioxygénases :

- les pyrocatéchases I et II de *Pseudomonas* sp. B13 induites par les halogénures aromatiques,
- la pyrocatéchase d'*Alcaligenes eutrophus* B9 induite par les benzoates.

Les valeurs des constantes d'affinité, K_m , et des constantes d'inhibition, K_i , de ces enzymes pour les catéchols diversement substitués ont été calculées à partir de l'équation de Michaelis et Menten. Les résultats montrent que le substituant électroattracteur (Cl) en position 3 confère une meilleure affinité (K_m plus petit) ainsi qu'une meilleure inhibition pour le substrat selon un mécanisme de type compétitif.

Ces auteurs ont essayé d'expliquer l'origine de cette inhibition en s'appuyant sur le mécanisme d'attaque de l'oxygène sur le catéchol (**Figure II.51**).

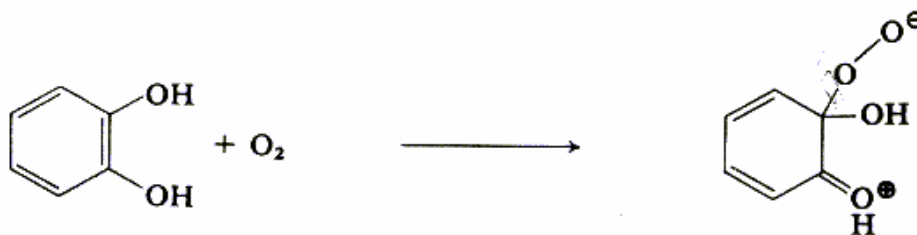


Figure II.51 : Mécanisme impliqué lors de l'attaque de l'oxygène sur le catéchol (d'après Dorn et Knackmuss, 1978).

L'attaque de l'oxygène sur le cycle aromatique est une réaction électrophile. Par conséquent, l'effet inductif attractif d'un halogène va diminuer le caractère nucléophile élevé du diphenol et défavoriser l'attaque électrophile par une dioxygénase. Les auteurs suggèrent que l'halogène en position *ortho* aura un effet électroattracteur plus important qu'en position *méta*.

Un exemple de structure 3D d'une catéchol 1,2-dioxygénase est présenté sur la **Figure II.52**. Cette enzyme provient d'une souche de *Rhodococcus* et contient un cluster $[2Fe-2S]$ et un $Fe(II)$ (Furusawa *et al.*, 2004). Les atomes de Fer sont en gris.

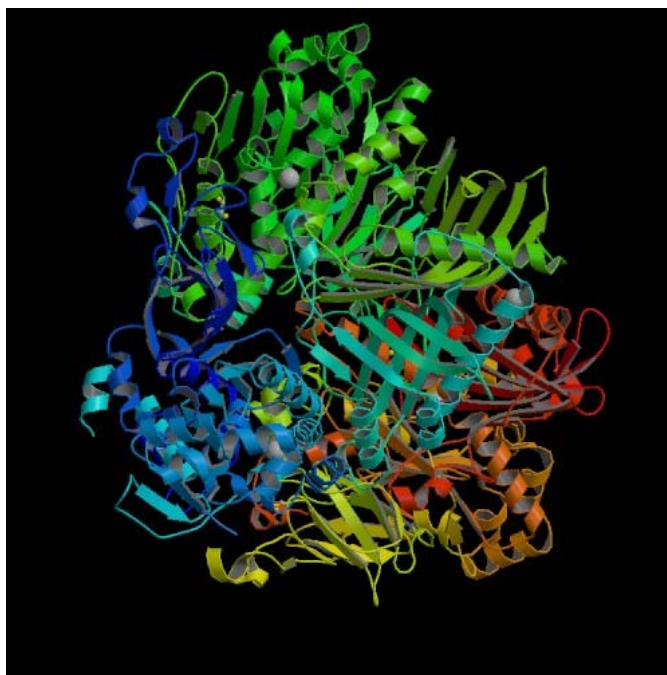


Figure II.52 : Structure 3D de la biphényl dioxygénase de *Rhodococcus* sp. *RHA1* (d'après Furusawa et al., 2004)

Fonctionnement des catéchol 2,3-dioxygénases

Contrairement aux catéchol 1,2-dioxygénases, les catéchol 2,3-dioxygénases sont le plus souvent des multimères d'un même type de sous-unités, chacune contenant un atome de fer (Eltis et Bolin, 1996). Elles ont une spécificité de substrats plus large que les catéchol 1,2-dioxygénases. Elles fonctionnent toutes avec du fer sous forme réduite Fe(II). Cet état d'oxydation du fer confère à l'enzyme la propriété de présenter un site pour lier spécifiquement l'oxygène et d'être en permanence coordonné selon une géométrie octaédrique. La suite du mécanisme réactionnel est alors similaire à celui des catéchol 1,2-dioxygénases. Cependant, dans le fonctionnement de cette enzyme, le substrat n'a pas besoin de subir un changement d'orientation aussi important que celui réalisé avec les catéchol 1,2-dioxygénases pour permettre à l'oxygène de se fixer. En 1989, Harayama et Rekik suggèrent de classer les catéchol 2,3-dioxygénases en deux familles selon leur affinité pour les substrats bicycliques et les substrats monocycliques.

L'inhibition de la catéchol 2,3-dioxygénase de *Pseudomonas putida* mt-2 par le Tiron (agent de chélation du fer : catéchol-3,5-disulfonate), le 3-chlorocatéchol, le 4-chlorocatéchol et le 3-fluorocatéchol a fait l'objet d'une étude par Bartels *et al.* (1984). Il semble que les catéchols halogénés soient des inhibiteurs compétitifs des catéchol 2,3-dioxygénases.

Dioxygénases contenant seulement du Fe(III) ou du Fe(II)

Comme nous l'avons déjà précisé, il existe également des dioxygénases contenant seulement du Fe(III) ou du Fe(II) sans la présence de cluster [2Fe-2S], qui catalysent directement les réactions d'oxydation du substrat. Ce type de structure a été rapporté récemment et ne figurait donc pas dans la revue de Bertini *et al.* (1996). Les exemples cités ci-après ont été recensés dans la banque de données des structures de protéines disponibles sur le site Web : RCSB PDB (www.rcsb.org). Le cas le plus général correspond à des dioxygénases contenant du Fe(III), la présence de Fe(II) étant très rare, citons le cas d'une dioxygénase d'origine humaine (Titus *et al.*, 2000).

A titre d'exemple, la structure 3D de la 2,3-dihydroxybiphényl-1,2-dioxygénase d'une souche de *Pseudomonas* sp. (Uragami *et al.*, 2001) est présentée dans la **Figure II.53**. Le Fe(III) (en gris) est présent dans chacune des sous-unités (**Figure II.53A**) qui s'assemblent dans un complexe protéique multimérique (**Figure II.53B**).

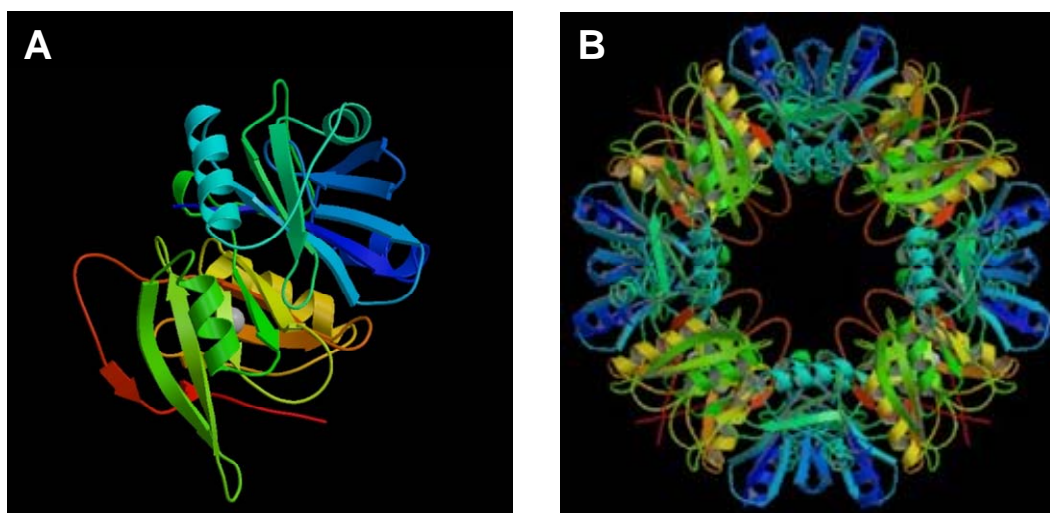


Figure II.53 : Structure 3D de la 2,3-dihydroxybiphényl-1,2 dioxygénase isolée d'une souche de *Pseudomonas* sp. (d'après Uragami *et al.*, 2001) A) Monomère, B) Assemblage multimérique.

Un autre exemple de dioxygénase contenant uniquement du Fe (III) est celui de la 4-chlorocatéchol 1,2-dioxygénase de *Rhodococcus opacus* 1CP (Ferranoni *et al.*, 2004). Comme précédemment, on observe un complexe multimérique (**Figure II.54**).

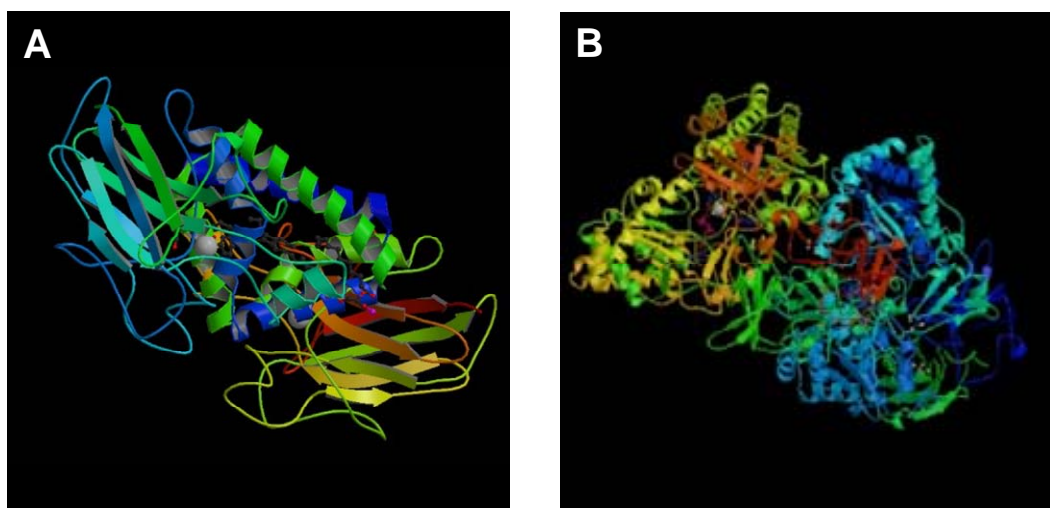


Figure II.54 : Structure 3D de la 4-chlorocatéchol 1,2-dioxygénase de *Rhodococcus opacus* 1CP (d'après Ferraroni *et al.*, 2004). A) Monomère, B) Complexe multimérique.

D'autres dioxygénases ont été décrites contenant du Fe(III) (Sugiyama *et al.*, 1995, Vetting et Ohlendorf, 2000, Earhart *et al.*, 2005, Ferraroni *et al.*, 2005),

II.3.3.3 Effet du fer sur la biodégradation de composés xénobiotiques

Peu d'études sont rapportées dans la littérature quant à l'effet du fer sur la dégradation de xénobiotiques.

Un premier type d'effet a été observé directement sur des enzymes purifiées, classiquement des dioxygénases contenant du Fe(II) en plus d'un cluster [2Fe-2S]. Il semble que lors de la purification de ce type d'enzyme en conditions aérobies, le Fe(II) puisse s'oxyder facilement en Fe(III) rendant alors l'enzyme inactive. L'ajout de Fe(II) à la solution contenant l'enzyme purifiée, réactive alors l'enzyme, le Fe(II) se plaçant dans le site libéré ou le site complexant beaucoup moins fortement le Fe(III). Ainsi par exemple, l'ajout de Fe(II) et/ou d'un agent réducteur permet d'augmenter l'activité de la catéchol 2,3-dioxygénase isolée de *Rhodococcus rhodochrous* CTM d'un facteur allant jusqu'à 7 fois (Candidus *et al.*, 1994). De même, Schach *et al.* (1995) rapportent que l'activité de la 2-oxo-1,2-dihydroquinoline 5,6-dioxygénase de *Comamonas testosteroni* 63 est augmentée par un facteur 1,5 si on rajoute du Fe(II), alors qu'elle est inhibée en présence d'agent chélatant de métal. En absence de Fe(II), la quantité de métabolite formé par la toluène dioxygénase de *Pseudomonas putida* est diminuée de 80% (Wackett *et al.*, 1988).

Un seul article relate l'effet direct de l'ajout de fer sur une dégradation de polluant organique en conditions aérobies, donc impliquant des mono- ou dioxygénases, par des

cellules entières. Dinkla et al. (2001) ont étudié dans le détail l'effet d'une limitation en fer sur la dégradation du toluène par deux souches de *Pseudomonas putida* comportant le plasmide TOL. Les activités des enzymes impliquées dans la voie « haute » et la voie « méta » de la dégradation du toluène ont été dosées plus ou moins directement (dans certains cas juste par consommation d'oxygène) dans des cultures de *P. putida* contenant des concentrations croissantes de fer (FeCl_3) dans le milieu de culture.

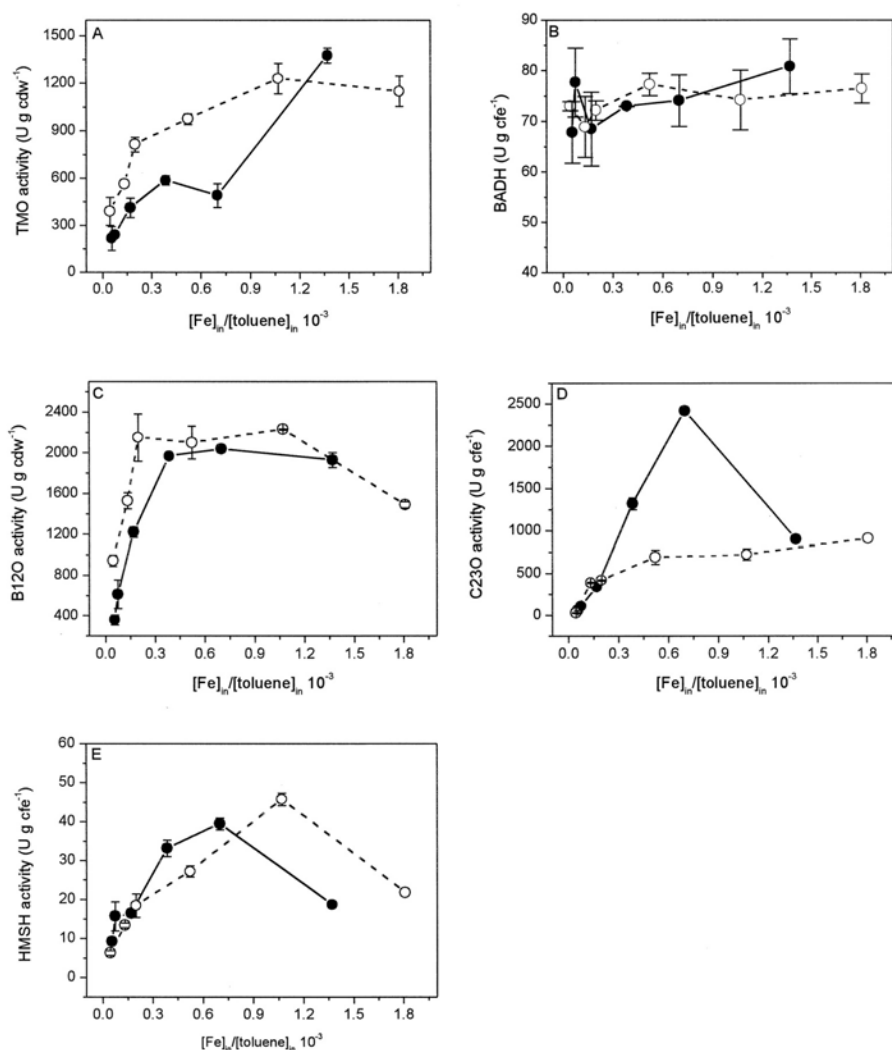


Figure II.55 : Activités des enzymes impliquées dans la biodégradation TOL lors de cultures continues de *P. putida* mt2 (●) et de *P. putida* WCS358(pWWO) (○) sur toluène. Les activités de la toluène monooxygénase (TMO) (A) et de la benzoate-1,2-dioxygénase (B12O) (C) sont décrites par la vitesse de consommation d'oxygène (micromoles par minute par gramme [poids sec] de cellules, (équivalent à des unités par gramme [poids sec] de cellule). Les activités de la benzyl alcool déshydrogénase (BADH) (B), de la catéchol-2,3-dioxygénase (C23O) (D), et de la HMSH (E) sont décrites par la vitesse de transformation du substrat (micromoles par minute par gramme de protéines dans l'extrait cellulaire, équivalent aux unités par gramme de protéines dans les extraits cellulaires). cdw, poids sec cellulaire (d'après Dinkla et al., 2001).

La **Figure II.55** présente la variation de chacune des activités enzymatiques en fonction des rapports $[\text{Fe}]/[\text{toluène}]$. Ces résultats montrent que la toluène monooxygénase (TMO) intervenant dans la voie haute a une activité diminuée en présence de faibles concentrations de fer alors que la benzyl-alcool déshydrogénase (BADH) n'est pas affectée. En ce qui concerne les enzymes de la voie « méta », toutes les activités enzymatiques sont affectées par une limitation en fer, à savoir la benzoate-1,2-dioxygénase (B120) et la catéchol-2,3-dioxygénase (C230) ainsi que l'hydroxy muconique semialdéhyde hydrolase (HMSH) bien que cette dernière enzyme ne contienne pas de fer. D'autres expériences ont montré que l'induction des gènes TOL augmentait la demande en fer pour chaque souche. Ces expériences montrent clairement la modulation des chemins métaboliques oxydatifs impliqués dans la dégradation de composés aromatiques impliquant mono et dioxygénases par la concentration en fer dans le milieu.

Par ailleurs, Andrews et Novak (2001) rapportent l'activation très nette par les ions Fe^{2+} de la dégradation du chloroforme (CF) produit lors de la dégradation du tétrachlorure de carbone (CT) en anaérobiose par la bactérie *Methanosarcina thermophila*. Environ 60% de moins de CF est produit et disparaît très rapidement. L'hypothèse donnée par les auteurs est que la présence de Fe^{2+} augmenterait la quantité de Fe^{2+} -porphyrine dans les cellules, qui peut catalyser la déchloration de CT en CF (Kleckla et Gonsior, 1984).

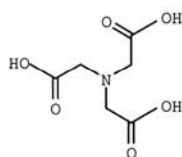
Les effets du fer ont également été suivis sur des boues activées de traitement d'effluents d'industrie papetière. En effet, ces effluents contiennent classiquement de l'EDTA, agent complexant des métaux, qui inhibe fortement l'activité des microorganismes sans doute en complexant les ions divalents de type Ca^{2+} ou les contre-ions présents au niveau des membranes. L'ajout de fer sous la forme de Fe-EDTA rétablit une activité des boues (Diez *et al.*, 2005) en empêchant l'effet nocif de l'EDTA.

II.4 LES COMPLEXES DE FER (APCAs) ET PLUS PARTICULIERMENT LE FENTA : PROCESSUS PHOTOCIMIQUES ET METABOLISATION PAR LES MICROORGANISMES

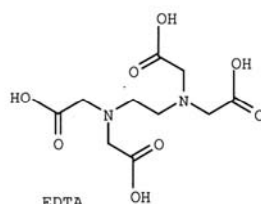
II.4.1 Les agents complexants

Les acides amino-polycarboxyliques (APCAs) sont des composés qui contiennent plusieurs groupes carboxylate liés à un ou plusieurs atomes d'azote (*Figure II.56A et B*).

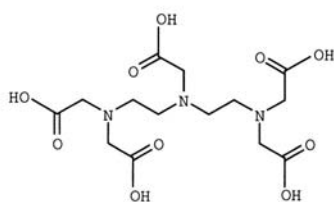
(A)



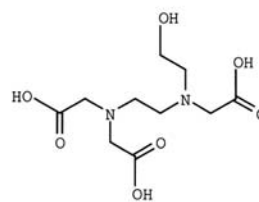
NTA
(Nitrilotriacetic acid)



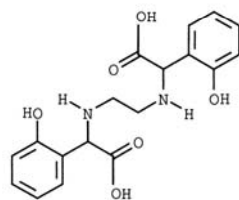
EDTA
(Ethylenediaminetetraacetic acid)



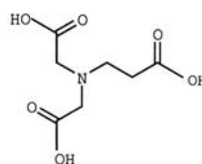
DTPA
(Diethylenetriaminepentaacetic acid)



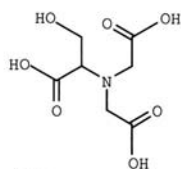
HEDTA
(Hydroxyethylethylenediaminetriacetic acid)



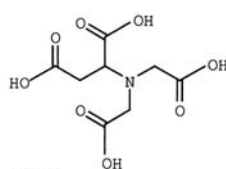
EDDHA
(Ethylenediaminedi(o-hydroxyphenyl)acetic acid)



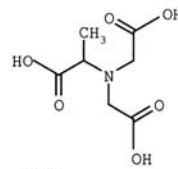
β -ADA
(b-Alaninediacetic acid)



SDA
(Serinediacetic acid)



ASDA
(Asparaginic acid diacetic acid)



MGDA
(Methylglycine diacetic acid)

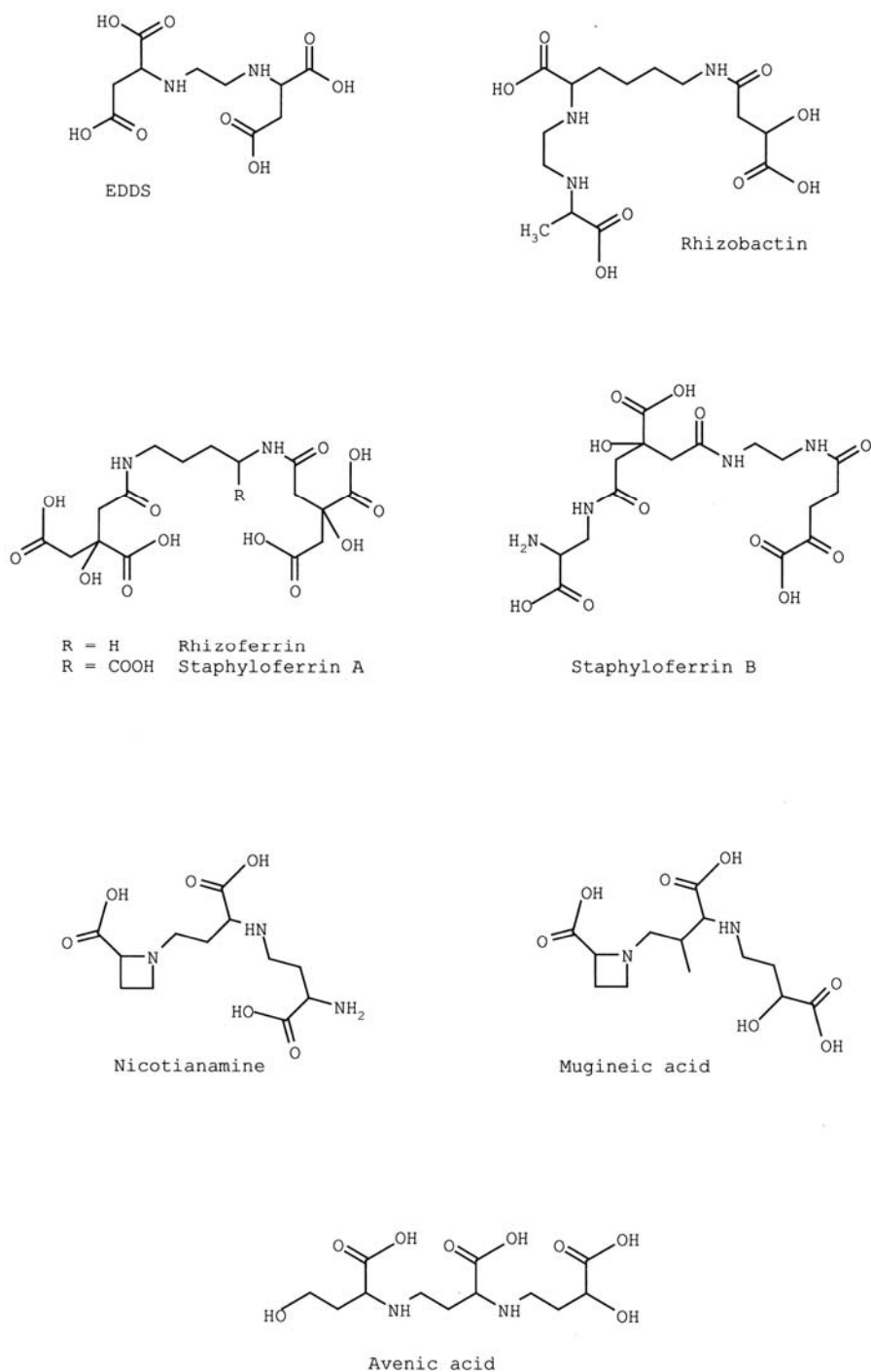
(B)

Figure II.56 : Formules chimiques des APCAs synthétiques (A) et naturels (B) les plus importants (d'après Bucheli-Witschel et Egli, 2001).

Ces acides aminopolycarboxyliques ont la capacité de former des complexes solubles dans l'eau avec de nombreux ions métalliques di- ou trivalents. Les APCAs forment des complexes très stables du fait de la formation à partir de l'azote d'une ou plusieurs sphères de coordination autour du métal (**Figure II.57**).

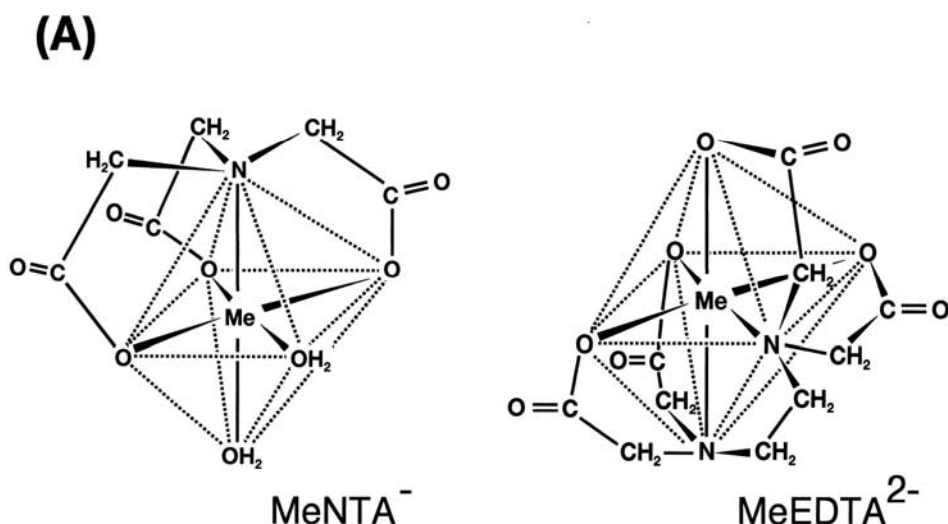


Figure II.57 : Structures octaédriques des complexes métal-NTA et métal-EDTA.

Pour décrire la stabilité de ce type de complexes métal-ligand une constante d'équilibre K est utilisée. Elle est définie comme

$$K = \frac{[MeL]}{[Me] \times [L]}$$

où $[Me]$ est la concentration en ion métallique, $[L]$ est la concentration en ligand et $[MeL]$ est la concentration en complexe à l'équilibre. Les constantes de stabilité des complexes 1:1 entre le NTA, EDTA ou EDDS et différents ions métalliques di- ou trivalents sont données dans le tableau suivant (**Tableau II.8**) :

Ions métalliques	$\log K_{MeNTA}$	$\log K_{MeEDTA}$	$\log K_{MeEDDS}$
Mg ²⁺	5,47	8,83	5,82
Ca ²⁺	6,39	10,61	4,23
Mn ²⁺	7,46	13,81	8,95 (+)
Zn ²⁺	10,66	16,44	13,49 (+)
Co ²⁺	10,38	16,26	14,06
Cu ²⁺	12,94	18,7	18,36
Pb ²⁺	11,34	17,88	12,7 (+)
Cd ²⁺	9,78	16,36	10,8 (+)
Al ³⁺	11,4	16,5	
Fe ²⁺	8,33 (+)	14,27	
Fe ³⁺	15,9	25,0	22,0 (+)
Ni ²⁺	11,5	18,52	16,79

Tableau II.8 : Constantes de stabilité de différents complexes pour une force ionique égale à 0,1 M et une température de 25°C ou (+) 20°C (d'après Bucheli-Witschel et Egli, 2001).

Du fait que les constantes de stabilité sont élevées pour de nombreux ions métalliques, les APCAs synthétiques sont présents dans de nombreux produits utilisés pour des applications domestique ou industrielle variées afin de contrôler la solubilité et la précipitation des ions métalliques. Les principaux APCAs synthétiques sont présentés **Figure II.56A**. Les deux principaux APCAs synthétiques utilisés à travers le monde sont l'acide éthylènediaminotétraacétique (EDTA) et l'acide nitrilotriacétique (NTA) (**Tableau II.9**).

	USA	Europe de l'Ouest
EDTA	42	13,6
NTA	32	8,3
DTPA	4	0,5
HEDTA	18	2,0
Autres APCAs	2,5	2,0
Sodium polyphosphates	586	1111
Organophosphonates	10	10
Acides hydroxycarboxyliques	110	15

Tableau II.9 : Estimation de la quantité des APCAs utilisés aux USA et en Europe en 1981 (10^3 tonnes). Pour comparaison sont également donnés les autres agents complexants synthétiques (d'après Bucheli-Witschel et Egli, 2001).

Du fait de l'utilisation majoritairement dans des milieux aqueux de ces agents complexants synthétiques comme le NTA et l'EDTA, ils vont se retrouver dans les eaux usées et donc atteindre les stations de traitement des eaux et les milieux aquatiques naturels. Ils vont donc subir des processus de dégradation biotique ou abiotique dans l'environnement. Nous présentons dans les paragraphes suivants une synthèse bibliographique des processus de photo- et biodégradation que peuvent subir ces agents complexants (APCAs) lorsqu'ils ont complexé le fer.

Plus récemment, il a été mis en évidence que des agents complexants de type APCAs sont naturellement produits dans l'environnement par des plantes ou des microorganismes. Ils sont directement impliqués dans les processus de consommation de métaux par ces organismes. Le premier et le plus étudié des APCAs produits naturellement est l'éthylènediaminedisuccinate (EDDS) qui a été isolé à partir d'une culture d'actinomycètes (*Amycolatopsis orientalis*).

II.4.2 Photodégradation des complexes de fer-APCAs

Les acides amino(poly)carboxyliques n'absorbent pas la lumière solaire et par conséquent ne sont pas photodégradables dans l'environnement naturel. Cependant, comme nous l'avons indiqué précédemment, ces acides amino(poly)carboxyliques sont très largement

utilisés dans l'industrie des détergents, la photographie, l'industrie pharmaceutique, l'industrie du textile. Par conséquent, plusieurs auteurs ont montré la présence de ces acides amino(poly)carboxyliques comme l'acide éthylènediaminotétraacétique EDTA, l'acide cyclohexanediaminotétraacétique CDTA, l'acide N-hydroxyéthylènediaminotriacétique HEDTA, l'acide iminodiacétique IDA et l'acide nitrilotriacétique NTA dans les effluents domestiques ou industriels. Cette famille de composés chimiques constitue une source de pollution dont les effets sur le compartiment aquatique peuvent être très dommageables (Andrianirinarivelo, 1992).

Cependant, une des voies d'élimination ou de dégradation de ces acides amino(poly)carboxyliques réside dans leur propriété d'agent complexant. En effet, le processus de complexation entre ces acides et les métaux de transition comme le fer, entraîne la formation d'un complexe qui a une bande d'absorption s'étendant jusque dans le domaine du visible. Ces complexes vont donc pouvoir absorber la lumière solaire et subir des mécanismes de photooxydoréduction.

Ainsi, dans la littérature, de nombreuses études ont été rapportées concernant la formation des complexes métal-acide amino(poly)carboxylique (Karadakov et Venkova, 1970 ; Lati et Meyerstein, 1978) et plus particulièrement avec le fer (Ogino *et al.*, 1989 ; Gustavson et Martell, 1963).

Les processus photochimiques observés lors de la dégradation des complexes acide amino(poly)carboxylique-fer(III) ont été décrits dans la littérature. Dans le cas de l'EDTA, employé comme agent chélatant dans les détergents, le complexe fer(III)-EDTA est de stoechiométrie 1-1 (Nuttal et Stalkir, 1977); sa structure et celle de l'EDTA ont été présentées précédemment.

Le rendement quantique de phototransformation de ce complexe a été évalué à 0,018 à 405 nm, et il augmente lorsque la longueur d'onde d'excitation diminue (Kari *et al.*, 1995). Cette transformation conduit à la formation de fer(II), de dioxyde de carbone, de formaldéhyde, d'acide éthylène diaminotriacétique (ED3A) et de complexe fer(II)-EDTA, le fer(II) pouvant être complexé par l'EDTA (Carey et Langford, 1973). L'efficacité de ce processus est cependant dépendant de la forme hydrolytique du complexe. Les différentes espèces du complexe de fer(III)-EDTA dépendent du pH (Stafford *et al.*, 1994). Dans le domaine de pH compris entre 4,0 et 8,0, FeEDTA^- et Fe(OH)EDTA^{2-} représentent 100% de l'EDTA mis en solution (**Figure II.58**).

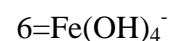
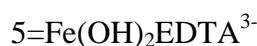
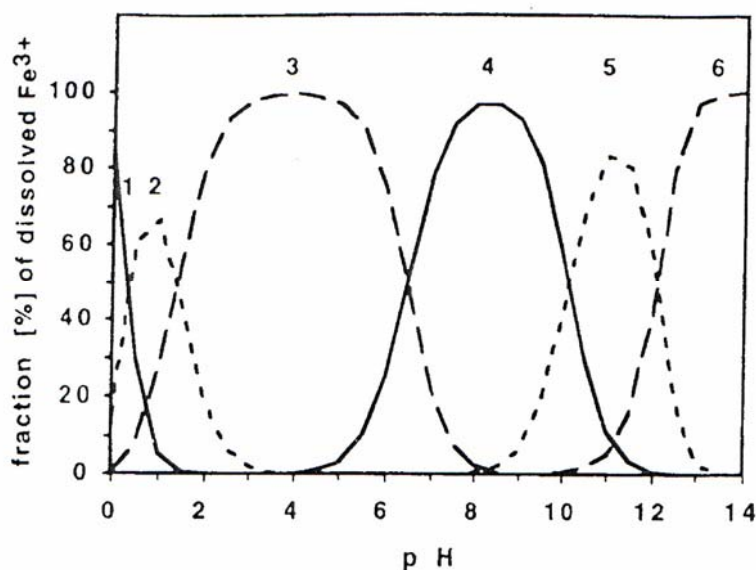


Figure II.58 : Distribution des complexes fer(III)-EDTA dans une solution aqueuse en fonction du pH (d'après Kari et al., 1995).

Dans le tableau suivant, nous avons répertorié quelques résultats d'études menées sur les rapports des rendements quantiques de formation entre ϕ_{HCHO} , ϕ_{CO_2} , $\phi_{\text{Fe}^{2+}}$ lors de l'irradiation du complexe fer(III)-EDTA. HCHO est un photoproduit de dégradation que l'on retrouve systématiquement avec ce type de complexe :

Fe-EDTA	$\lambda_{\text{exc}}(\text{nm})$	pH	$\phi_{\text{Fe}^{2+}}/\phi_{\text{CO}_2}$	$\phi_{\text{Fe}^{2+}}/\phi_{\text{HCHO}}$	Référence
$2 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$	254	Neutre	1,71		Natarajan et Endicott, 1973
$5 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$	254	Neutre	2,23		Natarajan et Endicott, 1973
$3 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$	254	Neutre	2,00		Natarajan et Endicott, 1973
$8 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$	350	9,0		1,7	Carey et Langford, 1975

Tableau II.10 : Rapports des rendements quantiques de formation de fer(II), HCHO et CO₂ lors de l'irradiation de complexes fer(III)-EDTA.

La phototransformation du complexe fer(III)-EDTA dépend également du pH et de la longueur d'onde d'irradiation. Dans la figure suivante, la photoréactivité du complexe est exprimée par les rendements quantiques de formation de fer(II) en fonction du pH et de la longueur d'onde d'irradiation (**Figure II.59**).

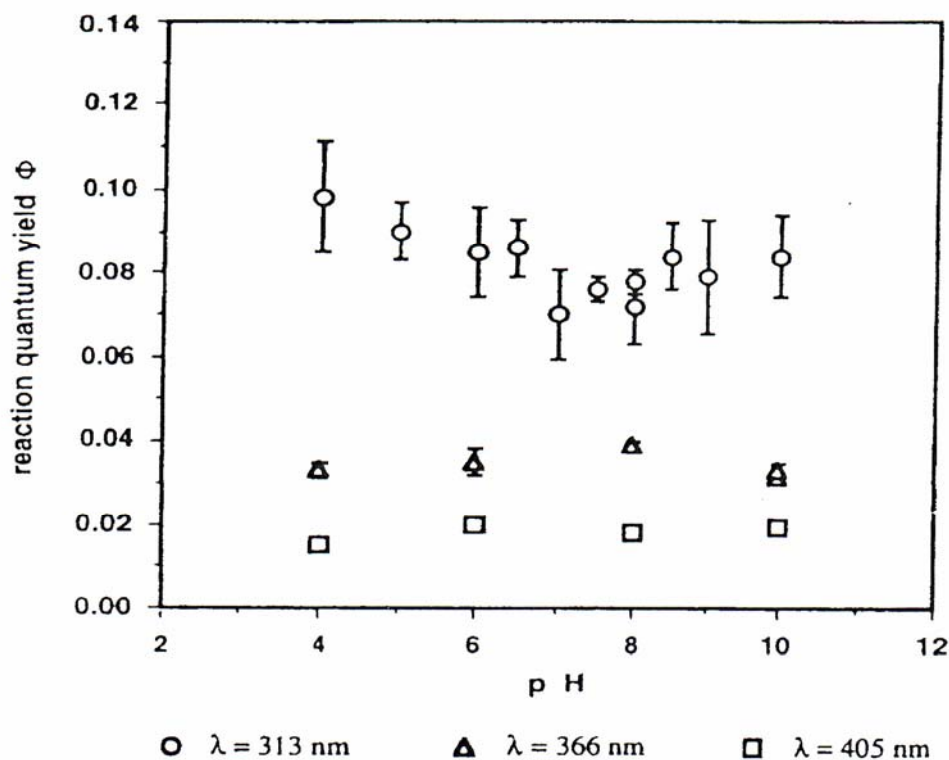
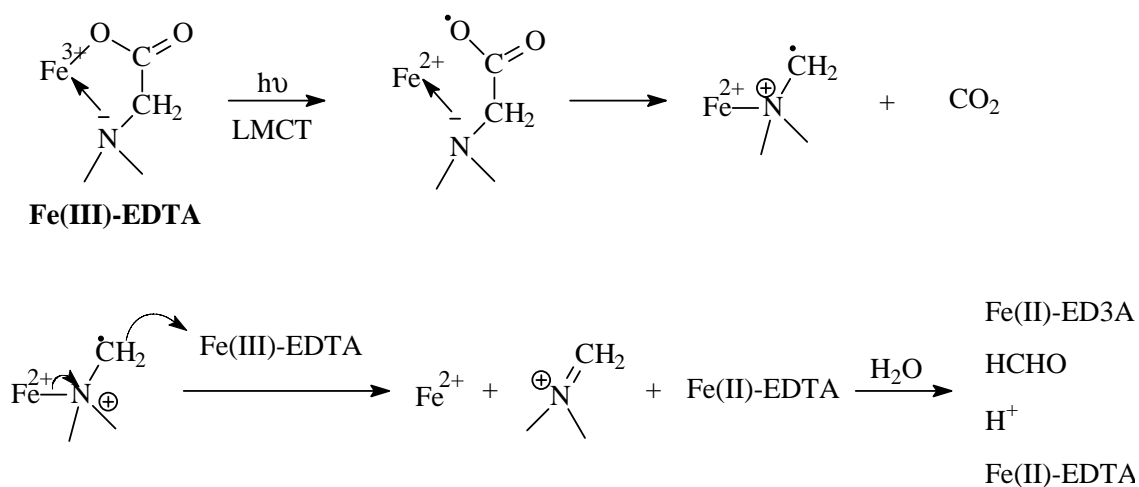


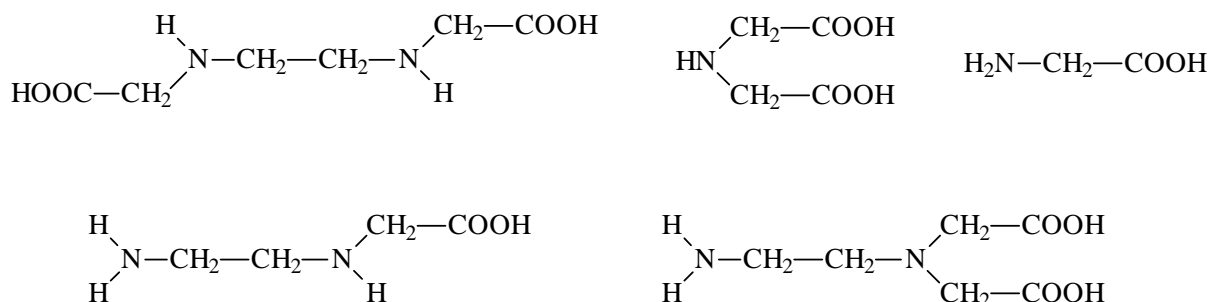
Figure II.59 : Rendements quantiques de formation du fer(II) lors de l'irradiation du complexe fer(III)-EDTA en fonction du pH et de la longueur d'onde d'irradiation (d'après Kari et al., 1995).

Nous retrouvons l'effet classique de la longueur d'onde d'irradiation avec une plus grande efficacité à courte longueur d'onde. L'effet du pH est beaucoup moins marqué et ne semble pas suivre une règle générale.

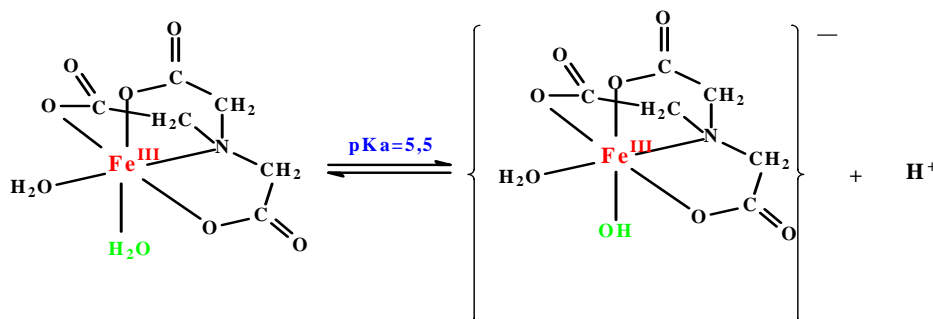
Le mécanisme primaire de dégradation du complexe fer(III)-EDTA peut se schématiser ainsi selon Carey et Langford (1973) :



La dégradation se poursuit par des ruptures successives des liaisons C-N du complexe fer(II)-ED3A et donne lieu à la formation des photoproduits suivants :



Le second acide amino(poly)carboxylique qui a été le sujet de nombreuses études est l'acide nitrilotriacétique (NTA). NTA est utilisé comme substitut des phosphates dans les détergents. Dans le cas du complexe fer(III)-NTA, l'étude de la photodégradation a été effectuée au sein du Laboratoire de Photochimie Moléculaire et Macromoléculaire. Le complexe fer(III)-NTA est principalement de stoechiométrie 1/1 (Andrianirinarivelo *et al.*, 1993 ; Nuttal et Stalkir, 1977). Le complexe fer(III)-NTA existe sous deux formes différentes en fonction du pH : il y a un équilibre protolytique entre les deux formes, l'une neutre et l'autre anionique avec un pK_a égal à 5,5.



En milieu neutre, la forme monohydroxylée du complexe est présente dans la solution. L'irradiation du complexe fer(III)-NTA dans ces conditions (milieu neutre) à 365 nm conduit au phénomène de photodécomplexation. Par contre sous irradiation à plus courtes longueurs d'onde (313 nm) la photodécomplexation est accompagnée d'un processus photorédox intramoléculaire entre le fer(III) et le groupement carboxylate (Faust et Zepp, 1993 ; Andrianirinarivelo *et al.*, 1993) conduisant à la formation de fer(II) et à une décarboxylation de l'acide nitrilotriacétique.

En milieu acide, Andrianirinarivelo *et al.* (1993) ont montré que la forme protonnée de fer(III)-NTA subit un processus de photooxydoréduction qui varie suivant la longueur d'onde d'irradiation. En effet, l'irradiation à 365 nm de la forme neutre du complexe conduit

à un processus de photooxydoréduction entre fer(III) et NTA. Par contre, sous irradiation à plus courtes longueurs d'onde, la réaction de photooxydoréduction implique un phénomène de transfert de charge entre le fer(III) et un oxygène d'une molécule d'eau complétant l'édifice du complexe fer(III)-NTA. Ces deux processus dépendant du pH de la solution conduisent néanmoins à la formation des mêmes photoproduits qui sont : le fer(II), l'acide iminodiacétique (IDA), le formaldéhyde et le dioxyde de carbone. L'IDA est le produit de dégradation qui pose problème car il est connu comme un composé cancérigène sous certaines formes (dérivés nitrosés), donc potentiellement dangereux pour la santé humaine. Pour cette raison mais aussi dans le but d'aller jusqu'à la minéralisation complète du NTA, des études ont été réalisées à partir de IDA (Mailhot *et al.*, 1995).

D'autre part, Andrianirinarivelo *et al.* (1993) ont montré que les rendements quantiques de disparition de fer(III)-NTA sont dépendants de la longueur d'onde d'irradiation, ainsi que du pH. En effet comme le montre le **Tableau II.11**, les rendements quantiques de disparition de fer(III)-NTA augmentent lorsque la longueur d'onde d'irradiation est plus courte et diminuent fortement quand le pH varie de 4,0 à 7,0.

λ_{exc} (nm)	ϕ_{dis} (à pH= 4,0)	ϕ_{dis} (à pH= 7,0)
254	0,50	0,19
296	0,40	0,18
313	0,30	0,08
334	0,22	
365	0,18	0,09

Tableau II.11 : Rendements quantiques de disparition de fer(III)-NTA en fonction de la longueur d'onde d'excitation et du pH.

Des études similaires ont été effectuées avec le complexe fer(III)-EDTMP (acide éthylènediaminotétraméthylènéphosphonique). Un processus photorédox intramoléculaire du même type que pour les complexants carboxylés a lieu entre le fer(III) et un groupement phosphonate (Matthijs *et al.*, 1989). Des ruptures successives de liaisons C-N conduisent à la formation de groupements orthophosphates PO_4^{3-} , de fer(II) et d'un composé final incapable de donner lieu à une complexation avec le fer(III) : l'acide N-méthylaminométhylène phosphonique.

Remarque : Dans toutes ces études sur les agents complexant du fer, l'avancement de la dégradation (éventuellement la minéralisation) dépend de la capacité des photoproduits à

complexer le fer(III). Par exemple, dans le cas du NTA en présence de fer, l'acide iminodiacétique est complexé par le fer uniquement dans des solutions de pH < 3,5. Donc dans de nombreux milieux naturels, la dégradation s'arrête à l'IDA qui est un produit potentiellement dangereux dans certaines conditions. L'efficacité des processus de phototransformation des complexes dépend donc fortement de l'agent complexant considéré.

II.4.3 Métabolisation des complexes de fer par des microorganismes

L'utilisation intensive des APCAs pour de nombreuses applications industrielles et domestiques a poussé à l'étude de la biodégradabilité de ces composés soit dans des milieux environnementaux complexes (stations d'épuration, eaux de surface, nappes phréatiques, sols et sédiments) soit par des souches pures isolées de ces milieux. Les composés les plus étudiés ont été le NTA et l'EDTA, mais aussi le DTPA et le [S, S]-EDDS. Comme nous le verrons, le NTA est relativement biodégradable alors que l'EDTA est beaucoup plus récalcitrant, sa dégradation dans l'environnement étant surtout abiotique (photochimique). C'est pourquoi la quantité de NTA retrouvé dans les stations d'épuration, les eaux, les sols et les sédiments est faible alors que l'EDTA y est dosé toujours de manière beaucoup plus importante.

Les données présentées dans ce chapitre sont tirées de deux revues très exhaustives du groupe de Thomas Egli (Bucheli-Witsechel et Egli, 2001; Egli, 2001).

II.4.3.1 Souches microbiennes pures dégradant les APCAs

Les isolats identifiés concernent principalement l'utilisation du NTA et de l'EDTA, quelques cas seulement ayant été décrits pour les autres composés. La plupart des microorganismes pouvant dégrader le NTA et l'EDTA sont des bactéries Gram négatif appartenant au groupe $\alpha 2$ des Protéobactéries. Il existe une exception : il s'agit d'une bactérie capable de croître sur APCAs en condition anaérobie (bactérie dénitrifiante) et appartenant au groupe γ -des Protéobactéries. Une souche Gram positive (*Corynebacterium*) a également été décrite comme capable de se développer très lentement en utilisant ce type de substrat. Le **Tableau II .12** récapitule les caractéristiques des souches les plus étudiées pour la dégradation du NTA et de l'EDTA.

Isolation substrate	Strain	Taxonomical position	Main properties	Respiration	μ_{\max} (h ⁻¹) on isolation substrate	Growth with APCAs other than isolation substrate
NTA	<i>C. asaccharovorans</i> strain TE1 and TE2	α -2 branch of <i>Proteobacteria</i>	Gram-negative, diplococci, non-motile, with S-layer, not utilising sugars	obligately aerobic	0.08–0.1	[S,S]-EDDS
	<i>C. heintzii</i> , strains TE4–TE10 and ATCC 29600 and ATCC 27109	α -2 branch of <i>Proteobacteria</i> , within the <i>Agrobacterium–Rhizobium</i> branch	Gram-negative, rods, pleomorphic, motile (1–3 subpolar flagella)	obligately aerobic	0.1–0.15	IDA
	strain TE11	γ -branch of <i>Proteobacteria</i> , closely related to <i>Xanthomonas</i>	Gram-negative, rods, motile	aerobic and denitrifying	0.08 (aerobic); 0.03 (denitrifying)	
EDTA	<i>A. radiobacter</i> ATCC 55002		Gram-negative, rods degrading EDTA only when complexed with Fe(III)	aerobic		PDTA (only when complexed with Fe(III))
	strain BNC1/DSM 6780	α -branch of <i>Proteobacteria</i>	Gram-negative, rods, non-motile when grown with EDTA	aerobic	0.024	NTA, IDA, ED3A
	strain DSM 9103	α -branch of <i>Proteobacteria</i> within the <i>Agrobacterium–Rhizobium</i> branch	Gram-negative, diplo-rods, non-motile	aerobic	0.06–0.07	NTA, IDA, N,N'-EDDA, [S,S]-EDDS

Tableau II.12 : Quelques propriétés des souches bactériennes les plus étudiées, capables d'utiliser les APCAs comme seule source de carbone, d'énergie et d'azote (d'après Bucheli-Witsechel et Egli, 2001).

II.4.3.2 Voies métaboliques impliquées dans la dégradation des APCAs

Les informations les plus importantes concernent la biodégradation du NTA. Elles ont été obtenues à partir des souches décrites dans le **Tableau II.12**.

Biodégradation du NTA

La **Figure II.60** résume les voies métaboliques impliquées dans la dégradation du NTA, par les souches *C. heintzii* et *C. asaccharovorans*.

La première étape correspond à l'entrée du NTA dans la cellule bactérienne. Bien que l'on pense que ce transport soit actif, les données concernant ce transport manquent cruellement. Une fois dans la cellule, le NTA est transformé en IDA (iminodiacétate) et glyoxylate soit *via* une NTA-monooxygénase (NTA-MO) utilisant l'oxygène de l'air, enzyme qui est couplée à une NADH :FMN oxydoréductase qui assure le transfert d'électrons, soit *via* une NTA-déshydrogénase (NTA-DH) ou encore *via* une nitrate réductase (NTA-NtrR). La NTA-MO et la NTA-DH sont cytoplasmiques alors que la NTA-NtrR est membranaire et utilise la transformation nitrate /nitrite comme chaîne de transfert d'électrons. Ces deux enzymes ont été identifiées au départ dans des conditions anaérobies. Plus récemment, une levure *Kluyveromyces marxianus* IMB3 a été décrite comme capable d'utiliser le NTA ou l'IDA comme seule source d'azote pour sa croissance (Ternan et McMullan, 2002). Les activités NTA-MO et IDA-DH ont notamment été mises en évidence sur des extraits

cellulaires, suggérant des voies métaboliques similaires chez la levure. Ces activités n'ont pas été détectées dans un milieu de croissance complet, ni dans un milieu carencé en azote. Il semblerait donc que ces enzymes soient inductibles. L'IDA peut à son tour être transformé en glyoxylate et en glycine par une iminodiacétate déshydrogénase. La dégradation d'une molécule de NTA conduit donc à deux molécules de glyoxylate et une molécule de glycine qui peuvent entrer ensuite dans le métabolisme central.

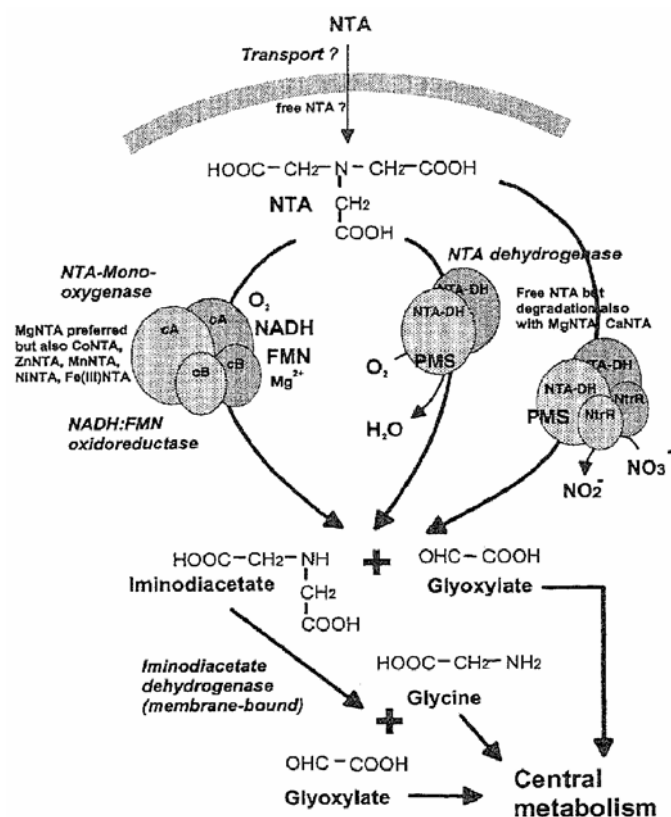


Figure II.60 : Métabolisme du NTA par *C. heintzii* et *C. asaccharovorans* (d'après Egli, 2001).

Biodégradation de l'EDTA

Le métabolisme de l'EDTA établi pour les souches d'*Agrobacterium* DSM 9103 et DSM6780 est présenté dans la **Figure II.62**. Il est moins bien connu que celui du NTA.

Le transport de l'EDTA est également inconnu : il s'agirait comme pour le NTA d'un transport actif, inductible. Les espèces EDTA-libre et MgEDTA, CaEDTA, MnEDTA sont transportées dans la cellule. Il faut noter que le DTPA (diéthylènetriamine-pentaacétate) peut utiliser le même transporteur : c'est un inhibiteur compétitif de l'EDTA.

L'EDTA-monooxygénase (EDTA-MO) fonctionne comme la NTA-MO et est couplée à une NADH:FMN oxydoréductase. Elle transforme dans un premier temps l'EDTA en ED3A (éthylènediaminetriacétate) et en glyoxylate, puis l'ED3A est à nouveau transformé en

N,N'-EDDA (éthylènediaminediacétate) et glyoxylate. A noter que l'EDTA-MO accepte aussi d'autres APCAs comme substrats : le NTA, le DTPA, le HEDPTA ; dans chaque cas, un groupe acétyle est éliminé et un glyoxylate généré. L'EDDA est ensuite transformé en glyoxylate et EDMA par une IDA oxydase, qui transforme encore l'EDMA en éthylènediamine et en glyoxylate. Au final, une molécule d'EDTA donne quatre molécules de glyoxylate et une molécule d'éthylènediamine qui peuvent rejoindre le métabolisme central.

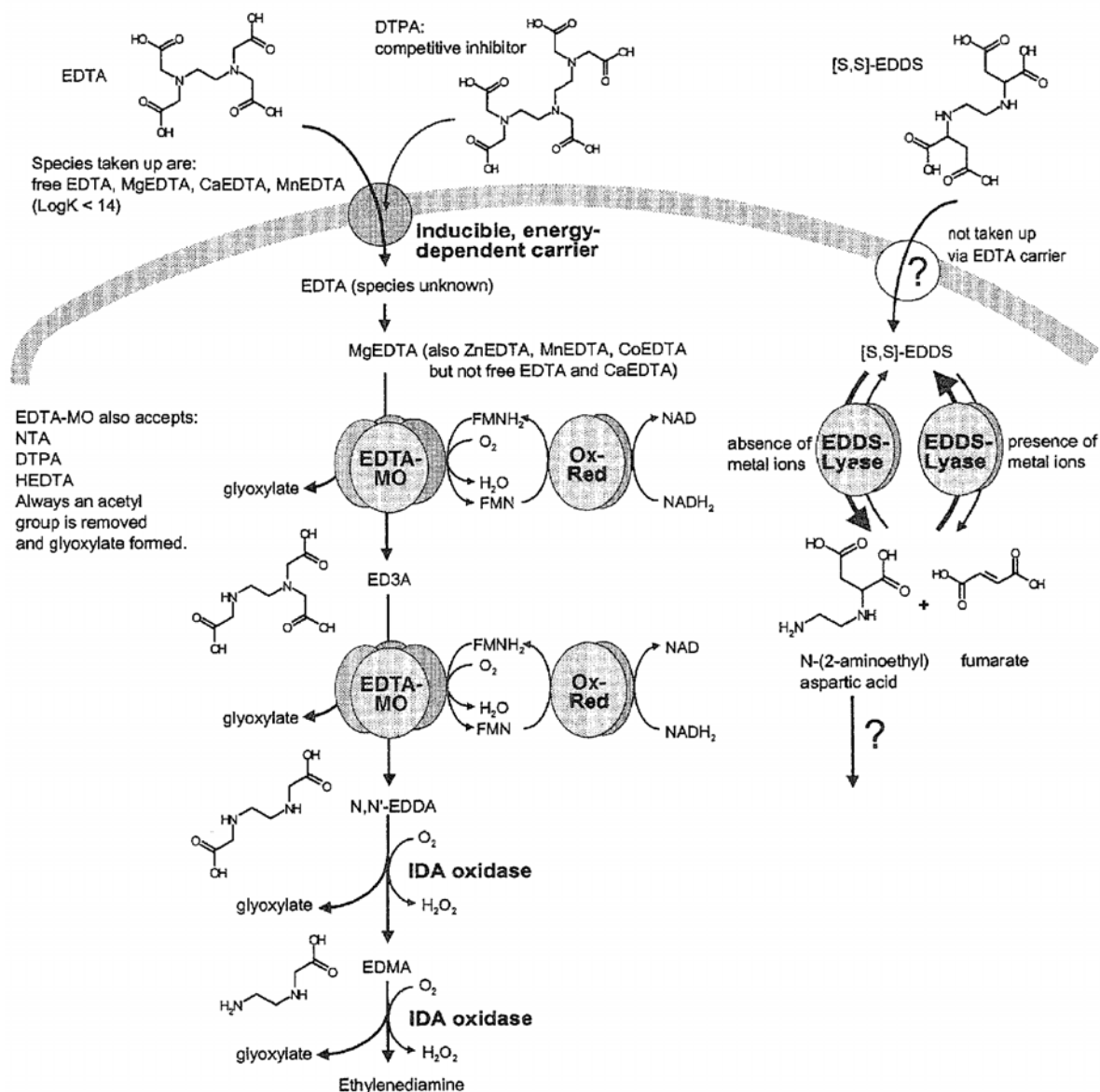


Figure II.61 : Métabolisme de l'EDTA et du [S,S]-EDDS chez *Agrobacterium* DSM 9103 et DSM6780 (d'après Egli, 2001).

Biodégradation du [S,S]-EDDS

Bien que le [S,S]-EDDS soit un isomère de l'EDTA, son métabolisme est totalement différent (**Figure II.61**). Son mode de transport n'est pas connu mais il n'emprunte pas le

transporteur de l'EDTA. D'autre part dans la souche étudiée (*Agrobacterium*), ni monooxygénase, ni déshydrogénase n'ont pu être mises en évidence, mais on a identifié une lyase qui coupe la liaison C-N entre la partie éthylènediamine et la partie succinyle du [S,S]-EDDS, sans co-facteur. Cette réaction conduit à la formation de fumarate directement intégré dans le métabolisme central et d'acide N-(2-aminoéthyl)aspartique dont on ne connaît pas le devenir.

II.4.3.3 Influence de la spéciation des complexes sur la métabolisation des APCAs

La spéciation des complexes est extrêmement importante et peut totalement modifier la métabolisation de ces composés. Elle joue à deux niveaux, d'une part pour le transport dans la cellule, et d'autre part pour certaines activités enzymatiques. En réalité il manque encore beaucoup d'informations concernant cette spéciation.

Il n'est pas clair si les APCAs sont transportés sous forme libre ou sous forme de complexe métallique. Au départ, si l'on considère que dans l'environnement les APCAs sont forcément sous forme de complexes, la cellule doit gérer la présence de métaux. Si le complexe métallique entre dans la cellule alors elle doit soit excréter l'excès de métal, soit le précipiter à l'intérieur de la cellule à l'aide d'autres ligands, par exemple des polyphosphates. Si au contraire elle transporte les APCAs sous forme libre, la bactérie doit alors dissocier le complexe avant son entrée dans la cellule ou bien jouer sur l'équilibre complexe-forme libre à l'extérieur de la cellule. Beaucoup de difficultés sont rencontrées pour aborder l'étude de la spéciation des APCAs, en particulier avec des cellules entières : 1) se pose d'abord le problème de la toxicité du métal, 2) ensuite la présence de divers ions métalliques dans le milieu et la présence de ligands à la surface de la cellule doivent être prises en compte puisqu'ils peuvent affecter totalement la spéciation des APCAs, 3) enfin si l'on arrive à caractériser la spéciation du complexe au départ, son suivi est ensuite très difficile.

Les études menées avec des cellules entières conduisent à des résultats très contradictoires, ceci vaut aussi bien pour le NTA que l'EDTA. Une étude chez *C. heintzii* montre par exemple que tous les complexes de NTA avec Ca^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Fe^{3+} et le NTA libre sont dégradés à l'exception du complexe avec Ni^{2+} .

Des études sur les enzymes purifiées ont permis de dégager certaines spécificités des enzymes du métabolisme des APCAs. Pour le NTA, le lecteur peut se référer à la **Figure II.60** (Egli, 2001). La NTA-monooxygénase accepte comme substrat le MgNTA, CoNTA, ZnNTA, MnNTA, NiNTA et Fe(III)NTA ; le meilleur substrat est le MgNTA. Par contre la

NTA-déshydrogénase ne peut utiliser que le NTA sous forme libre. Enfin la nitrate-réductase accepte le NTA libre et les complexes de Mg^{2+} et de Ca^{2+} . Pour l'EDTA (**Figure II.61**) la monooxygénase accepte du MgEDTA, ZnEDTA, MnEDTA, CoEDTA mais pas le CaEDTA ni l'EDTA libre. Enfin l'EDDS lyase (**Figure II.61**) accepte soit l'EDDS libre, soit certains complexes de Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ba^{2+} et Mn^{2+} . D'une manière générale on a pu noter l'acceptation comme bons substrats des complexes Mg/APCA ce qui serait compatible avec la présence majoritaire de Mg^{2+} à l'intérieur de la cellule. Une étude récente a montré la potentialité de granules microbiens aérobies (agrégats microbiens auto-immobilisés issus d'une culture mixte, qui se forment sans matériau support) dans le traitement d'eaux chargées en NTA et en fer(III) (Nancharaiah *et al.*, 2006). Ces granules ont permis la dégradation complète de 2 mM de NTA et de Fe(NTA) en 14 et 40h respectivement à l'échelle d'un réacteur de laboratoire (3L). Le NTA libre est dégradé à une vitesse spécifique de $0,7 \text{ mM h}^{-1}$ tandis que Fe(NTA) est dégradé à $0,37 \text{ mM h}^{-1}$. Il semble que les cinétiques de disparition moins rapides du Fe(NTA) observées soient le résultat de la superposition des processus d'adsorption et de biodégradation, les granules adsorbant le FeNTA jusqu'à saturation pendant la mise en place du système enzymatique inductible pour la dégradation. Les granules peuvent être utilisés jusqu'à 4 fois consécutivement sans perte de leur capacité dégradante du NTA. Il est à noter que dans ces réacteurs, NTA constitue la seule source de carbone et que cet agent complexant ne semble pas avoir d'effet sur le mécanisme de co-aggrégation et la formation des granules.

Il est bien évident que le problème de la spéciation des complexes est d'autant plus compliqué que l'on se situe dans un réel contexte environnemental et non pas en laboratoire. Beaucoup de progrès restent à faire pour la compréhension du lien entre spéciation et biodégradabilité des APCAs.

II.4.4 Dégradation des APCAs : processus abiotiques vs processus biotiques

Pour conclure ce chapitre sur les APCAs, et plus particulièrement les complexes de fer, la **Figure II.62** résume l'ensemble des processus biotiques et abiotiques impliqués dans la dégradation des complexes de l'EDTA, du NTA et du[S,S]-EDDS.

Les voies métaboliques que nous avons vues dans les sections précédentes permettent d'envisager une minéralisation complète de ces complexes métalliques, notamment ceux du Fer (voie 2 de la **Figure II.62**). En fait les données expérimentales montrent que ceci est surtout vrai pour le NTA que l'on ne retrouve pratiquement pas.

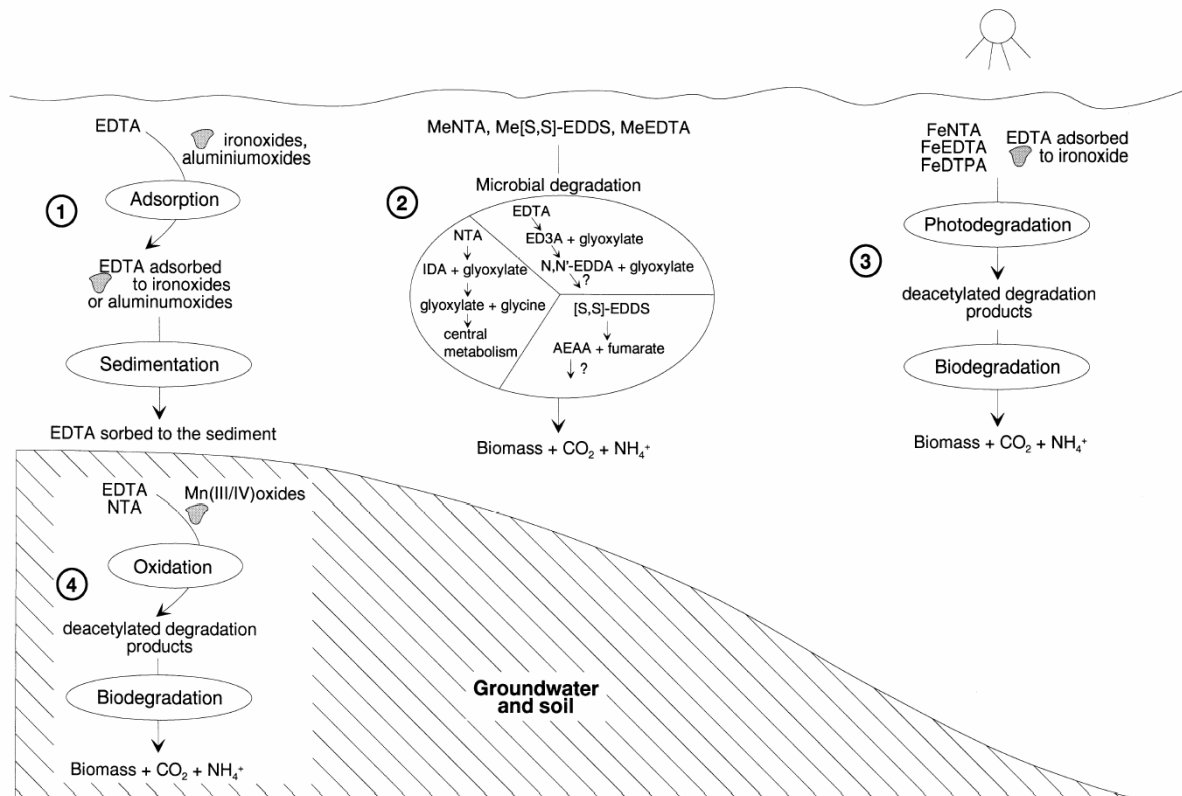


Figure II.62 : Processus biotiques et abiotiques déterminant le devenir des APCAs dans les stations d'épuration et dans l'environnement (d'après Bucheli-Witsechel et Egli, 2001).

Les complexes de Fe(III) du NTA, de l'EDTA et du DTPA sont facilement photolysés comme nous l'avons vu précédemment. Ceci est également vrai pour l'EDTA adsorbé sur des oxydes de fer (voie 3 de la **Figure II.62**). Cependant ces réactions photochimiques ne conduisent pas à une totale minéralisation de ces complexes. Les photoproduits formés peuvent éventuellement être ensuite biodégradés par des microorganismes. Citons par exemple l'IDA, la glycine, le formaldéhyde et le formiate formés lors de la photodégradation du FeNTA, tous pouvant être utilisés par certains microorganismes et conduire à une minéralisation.

D'autres processus peuvent encore intervenir. Par exemple les APCAs, en particulier l'EDTA, peuvent s'adsorber sur des minéraux chargés positivement comme des oxydes de fer ou d'aluminium. Ces particules peuvent alors sédimenter et contribuer au devenir de ces composés dans les lacs (voie 1 de la **Figure II.62**). Un autre processus est décrit dans la voie 4 de la **Figure II.62** : l'EDTA ou le NTA peuvent être oxydés de manière abiotique par des oxydes de manganèse conduisant à des déacylations comme dans le cas de la photodégradation. Les produits d'oxydation peuvent alors être minéralisés par les

microorganismes. Cependant l'importance de ce type de processus dans l'environnement est encore inconnue.

II.4.5 Photodégradation de composés organiques induite par des complexes APCAs de fer(III) en solution aqueuse

Comme nous l'avons mentionné précédemment, la photolyse directe des complexes polycarboxylate de fer(III) ou aminopolycarboxylates de fer(III) conduit sous irradiation à l'oxydation des ligands et également à la réduction du fer(III) en fer(II). Il a de plus été montré que les complexes de fer(III) jouent un rôle très significatif sur la production d'espèces réactives comme HO^\bullet , $\text{O}_2^{\bullet-}$ et H_2O_2 sous irradiation (Sedlak et Hoigné, 1993 ; Faust et Zepp, 1993).

Dans la littérature, les études scientifiques sur la photodégradation de composés organiques induite par des complexes polycarboxyliques ou aminopolycarboxyliques de fer sont limitées. La dégradation de ces composés photoinduite par les complexes polycarboxyliques de fer(III) a été attribuée principalement à l'attaque de radicaux hydroxyle générés par irradiation de ces complexes de fer(III) (Zepp *et al.*, 1992). Ici nous présentons comme exemple la dégradation de la molécule d'atrazine (**Figure II.63**) photoinduite par le complexe de ferrioxalate en solution aqueuse (Balmer et Sulzberger, 1999).

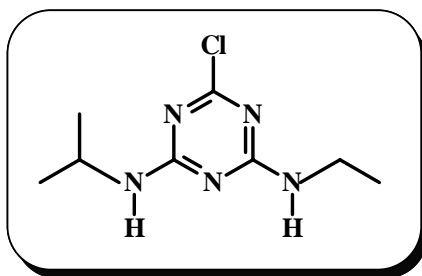


Figure II.63 : Molécule d'atrazine.

La **Figure II.64** représente la disparition d'atrazine lors de son irradiation en présence de ferrioxalate. L'irradiation réalisée en présence de fer(III) seul, sans oxalate, conduit à la dégradation de l'atrazine. Cette dégradation est attribuée au complexe aqueux de fer(III) qui sous irradiation génère des radicaux hydroxyle capables de réagir sur l'atrazine. En présence d'oxalate $18 \mu\text{mol.L}^{-1}$, la vitesse de dégradation de l'atrazine augmente. Cette vitesse de dégradation augmente fortement avec la concentration d'oxalate ajoutée en solution aqueuse. Par contre, si on ajoute du méthanol ($250 \mu\text{mol.L}^{-1}$) au milieu, la dégradation de l'atrazine est

complètement inhibée (*Figure II.64*). Le méthanol joue ici le rôle de piège à radicaux générés photochimiquement à partir du complexe ferrioxalate.

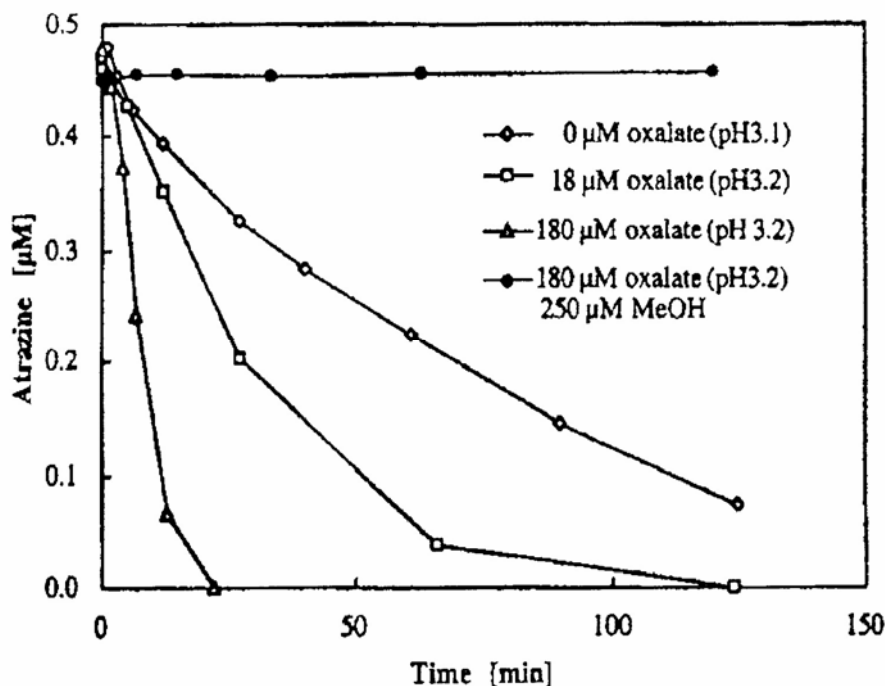


Figure II.64 : Dégradation de l'atrazine photoinduite par le ferrioxalate.

Balmer et Sulzberger (1999) ont étudié de manière précise l'influence de la concentration en oxalate et l'influence du pH de la solution sur la photoactivité du ferrioxalate. Ils ont remarqué la formation d'espèces très photoactives de di et tri-oxalate lorsque la concentration d'oxalate augmente en solution aqueuse (oxalate = $180 \mu\text{mol.L}^{-1}$). D'autre part, ils ont montré l'effet du pH sur la dégradation sous irradiation de l'atrazine en présence de ferrioxalate. Ils ont mis en évidence que la vitesse de disparition de l'atrazine augmente dans cet ordre de pH : $7,5 < 5,6 < 3,2 < 4,3$ en présence de $18 \mu\text{mol.L}^{-1}$ d'oxalate.

En revanche, lorsque la concentration en oxalate est égale à $180 \mu\text{mol.L}^{-1}$, la vitesse de dégradation de l'atrazine augmente dans cet ordre de pH : $7,9 < 3,2 < 4,6 \approx 5,4$. Balmer et Sulzberger (1999) ont attribué ces résultats à l'existence de plusieurs processus en compétition. Premièrement, le pH et la concentration d'oxalate en solution aqueuse influencent et contrôlent la spéciation des complexes de fer(III) et donc ainsi la vitesse de photolyse *via* ces complexes. (*Figure II.65*).

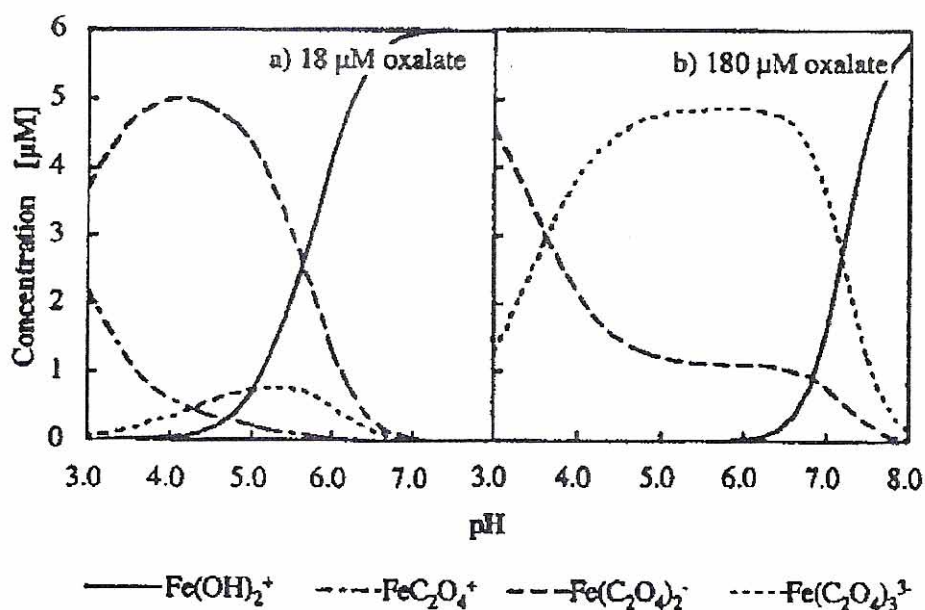


Figure II.65 : Distribution du complexe de ferrioxalate en fonction de la concentration d'oxalate et du pH.

Deuxièmement, ils ont noté que le pH et la concentration d'oxalate influencent également très fortement la concentration et la spéciation du fer(II) formé. Ainsi son oxydation en fer(III) sera plus aisée en milieu neutre, en présence d'oxalate et par réaction avec H_2O_2 formée lors du processus photochimique. De plus, parallèlement à l'attaque des radicaux hydroxyle sur l'atrazine, les radicaux hydroxyle peuvent aussi réagir avec l'oxalate ce qui implique une compétition en terme de réactivité pour les radicaux hydroxyle formés sous irradiation.

Nous présentons comme deuxième exemple, la dégradation de colorants photoinduite par le complexe fer(III)-citrate en solution aqueuse. Deng *et al.* (1998) ont étudié la dégradation de cinq colorants (C.I. rouge réactif 2, C.I. bleu réactif 4, C.I. noir réactif 8, C.I. rouge basique 13, C.I. jaune basique 2) photoinduite par le citrate de fer(III) en solution aqueuse (pH = 2,0) ($\lambda = 313 \text{ nm}$). Lors de l'irradiation, la photolyse des complexes de citrate de fer(III) conduit à la formation de radicaux très réactifs, qui peuvent ensuite induire la dégradation du colorant. Sur la **Figure II.66** sont représentées les différentes cinétiques de disparition d'un colorant photoinduite par le citrate de fer(III) en fonction de la concentration initiale de colorant. On peut remarquer que la vitesse de dégradation du colorant diminue quand sa concentration initiale augmente en gardant la même concentration initiale de citrate de fer(III) (**Figure II.66**).

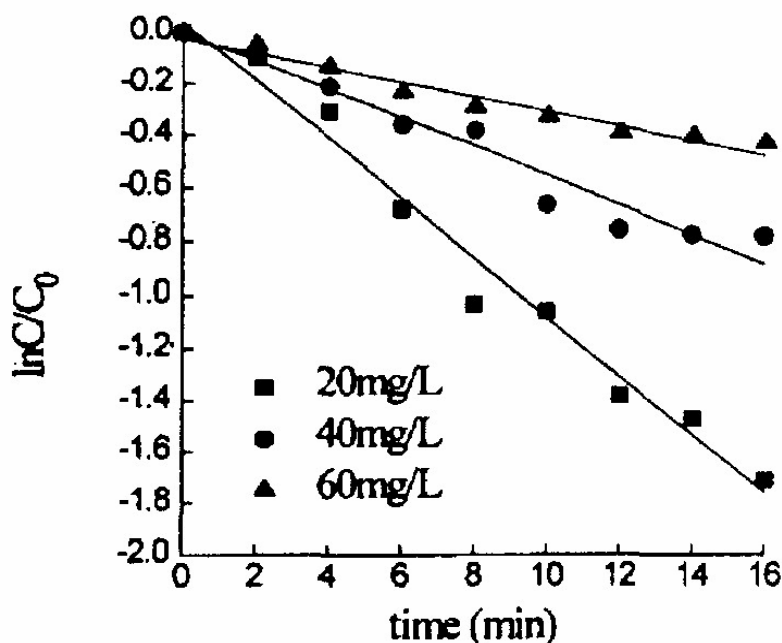


Figure II.66 : Disparition d'un colorant à ■ 20 mg.L⁻¹, ● 40 mg.L⁻¹ et ▲ 60 mg.L⁻¹ sous irradiation ($\lambda = 313$ nm) en présence de fer(III) citrate (10^{-4} mol.L⁻¹, 2×10^{-4} mol.L⁻¹).

De plus, Deng *et al.* (1998) ont évalué les constantes de vitesse de photodégradation des différents colorants sous irradiation en présence de citrate de fer(III) (*fer(III)*: 10^{-4} mol.L⁻¹, *citrate* : 2×10^{-4} mol.L⁻¹) (**Tableau II.9**). Les résultats montrent que les vitesses de disparition dépendent fortement de la structure du composé organique mis en solution.

Colorants	k_{disp} (constante de vitesse en min ⁻¹)
C.I rouge réactif 2	0,1125
C.I. bleu réactif 4	0,0169
C.I. noir réactif 8	0,0172
C.I. rouge basique 13	0,0536
C.I. jaune basique 2	0,0518

Tableau II.9 : Constantes de vitesse de dégradation des colorants photoinduite par le citrate de fer(III) sous irradiation.

Une étude a également été menée sur le rapport entre la concentration de fer(III) et celle de citrate. Ce rapport va déterminer et influencer la distribution des différents complexes en solution aqueuse et donc influencer fortement les processus de photodégradation des

colorants. Dans le **Tableau II.10**, sont répertoriées les différentes vitesses de dégradation des colorants en fonction du rapport entre les concentrations en fer(III) et en citrate en solution aqueuse et sous irradiation à $\lambda = 313$ nm (**Tableau II.10**):

Rapport de concentration		Vitesse de disparition du colorant (min^{-1})
Fe(III) ($10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$)	Cit $^{3-}$ ($10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$)	
1	4	0,1283
1	2	0,1125
1	1	0,0862
2	1	0,0638
4	1	0,1001

Tableau II.10 : Effet du rapport $[\text{Fe(III)}]/[\text{Cit}^{3-}]$ sur la vitesse de photodégradation du colorant (C.I rouge réactif 2, 20mg/L) en solution aqueuse ($\text{pH} = 2,0$, $\lambda = 313$ nm) .

Plus récemment, une étude a été menée par Abida *et al.* (Abida *et al.*, 2006 ; Abida, 2005) sur l'impact du couple lumière-complexe de fer (FeNTA et FeCitrates) sur la dégradation du 4-chlorophénol en solution aqueuse. Pour les deux complexes étudiés, un impact important sur la dégradation du 4-chlorophénol a été mis en évidence, celle-ci est plus rapide lorsque la concentration en complexe est plus élevée (**Figure II.67**).

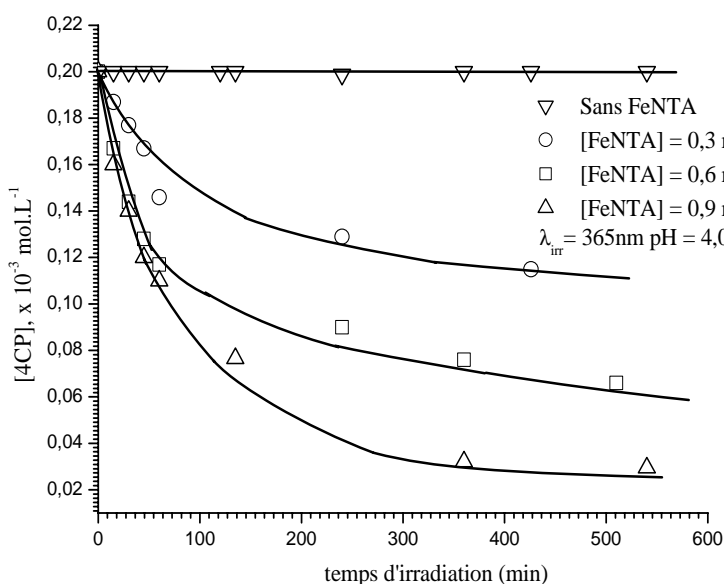


Figure II.67 : Disparition du 4-chlorophénol (4-CP) dans la solution en fonction de la concentration initiale en FeNTA. $[4\text{-CP}] = 2 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$; $\lambda_{\text{excitation}} = 365 \text{ nm}$; $\text{pH} = 4,0$; solution aérée.

Pour les deux complexes, il est importante de noter que la disparition du 4-chlorophénol est fortement dépendante de la longueur d'excitation : plus la longueur d'onde est courte, plus la vitesse de disparition du 4-chlorophénol est importante. En absence d'oxygène, aucune disparition de 4-chlorophénol n'est observée.

Des études originales en spectroscopie de Résonance Paramagnétique Electronique (RPE) sous irradiation ont permis de mettre en évidence les différents radicaux formés au cours du processus photoredox intervenant dans ces complexes de fer. Suivant la longueur d'onde d'irradiation, nous observons i) soit à plus grandes longueurs d'onde, le RCO_2^\bullet qui va ensuite évoluer vers la formation du radical H^\bullet puis en présence d'oxygène vers la formation de radicaux HO_2^\bullet ii) soit la formation du radical $\text{CO}_3^{\bullet-}$, qui peut réagir directement sur le 4-chlorophénol. Le mécanisme de dégradation du 4-chlorophénol photoinduit par le complexe FeNTA est présenté dans les **Figures IV.68 et IV.69** :

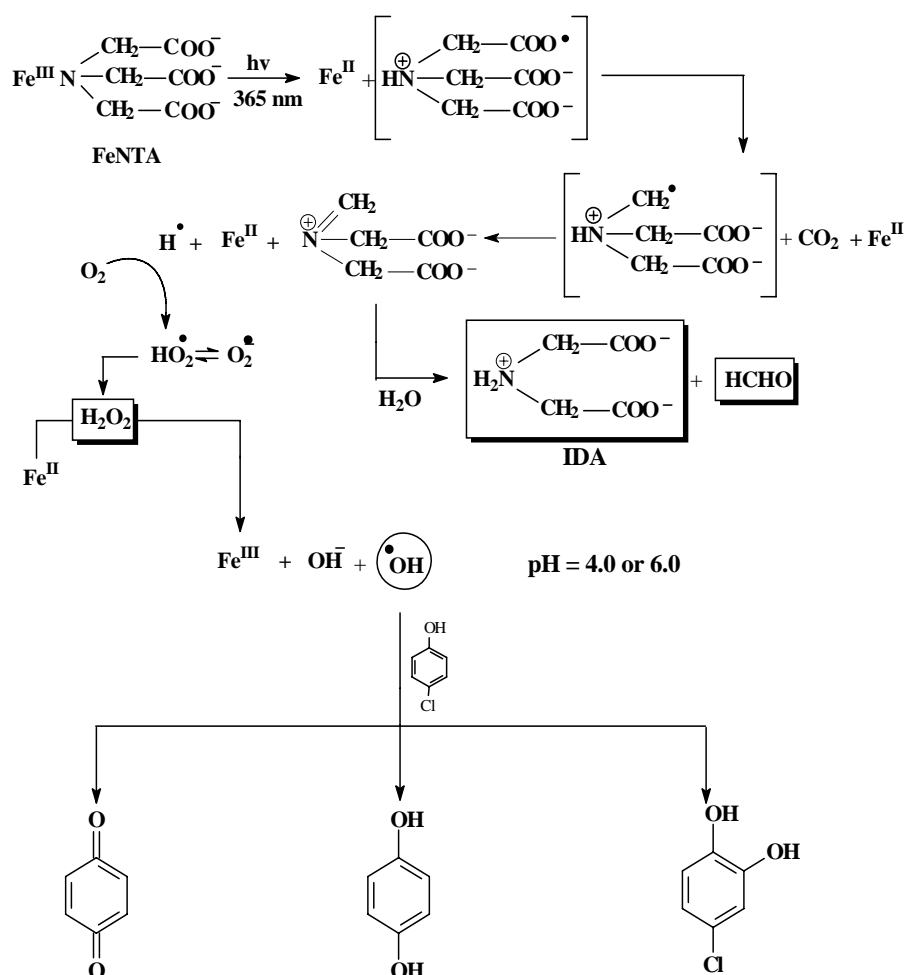


Figure II.68 : Mécanisme de dégradation du 4-chlorophénol photoinduite par le complexe FeNTA à $\lambda > 345 \text{ nm}$ (d'après Abida et al., 2006).

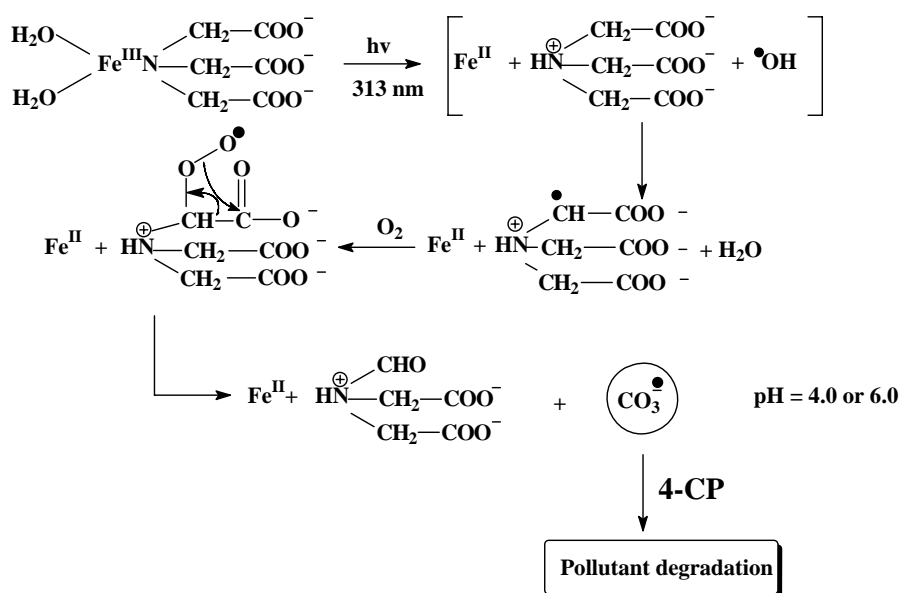


Figure II.69 : Mécanisme de dégradation du 4-chlorophénol photoinduite par le complexe FeNTA à $\lambda > 310 \text{ nm}$ (d'après Abida et al., 2006).

Malgré les différences observées pour le rendement quantique de disparition du complexe et du 4-chlorophénol et sur les mécanismes mis en jeu, en fonction du pH et de la longueur d'onde d'irradiation, les mêmes photoproduits primaires (hydroquinone, benzoquinone et 4-chlorocatéchol) ont été obtenus.

La grande différence que nous avons notée entre les deux complexes de fer étudiés est le fait que l'efficacité du complexe Fe-Citrate pour la dégradation du 4-chlorophénol est fortement dépendante du pH (plus rapide à pH 3,0 par rapport à pH 6,0), alors qu'elle est identique pour le complexe FeNTA.

Ces conclusions mettent en avant une fois de plus l'importance de ne pas se cantonner à la seule disparition du polluant de départ mais de suivre les voies de dégradation jusqu'à la transformation finale.

III

OBJECTIFS

Au terme de cette étude bibliographique, plusieurs points se dégagent clairement :

- Les benzothiazoles sont des composés largement utilisés au niveau industriel. Ils sont pour la plupart très récalcitrants: peu de souches microbiennes pures sont capables de les dégrader et ils sont en général insensibles à une photolyse directe. Leurs voies de biodégradation ne sont bien connues que pour quelques espèces bactériennes et leurs comportements photochimiques sont encore très peu étudiés.
- Certains benzothiazoles sont retrouvés dans les eaux usées domestiques, les eaux de ruissellement des routes, les eaux industrielles, les eaux de surface mais aussi dans les effluents de stations d'épuration urbaines.
- L'élimination de ces composés du milieu aquatique requiert donc de nouvelles méthodes combinant différents procédés. Quelques exemples de la littérature montrent que la combinaison photo-biodégradation peut être efficace pour la dégradation de composés organiques.
- Nous avons également vu dans la littérature que le fer joue un rôle clé dans l'environnement. C'est un élément photoinducteur pour la dégradation de polluants organiques. Il intervient également dans les réactions d'oxydo-réduction catalysées par les enzymes de type mono ou dioxygénases impliquées dans la dégradation de composés organiques.

Tous ces éléments nous ont conduits à proposer une approche originale combinant la bio- et la photodégradation de benzothiazoles en utilisant une souche pure de *Rhodococcus rhodochrous* déjà étudiée pour ses capacités biodégradatives au laboratoire SEESIB et des sels de fer, notamment le complexe FeNTA bien étudié au laboratoire LPMM.

L'objectif à long terme est d'évaluer la faisabilité d'une telle démarche et sa valorisation.

Les objectifs plus précis de cette thèse sont les suivants :

- Evaluer l'efficacité de dégradation de ces composés par les différents processus combinés ou non,
- Etablir les voies de dégradation des deux composés modèles (le benzothiazole et le 2-aminobenzothiazole) en considérant les processus séparés, microbiologique et photochimique seuls, et les processus combinés (biodégradation en présence de fer, avec ou sans lumière),
- Comprendre les mécanismes impliqués dans les processus de dégradation et notamment le rôle du fer.

IV

MATERIEL ET METHODES

IV.1 REACTIFS ET SOLVANT

- 2-aminobenzothiazole (ABT), Aldrich, >97%.
- 2-amino-6-hydroxybenzothiazole (6OH-ABT), synthétisé au laboratoire SEESIB.
- 2-amino-4-hydroxybenzothiazole (4OH-ABT), synthétisé au laboratoire SEESIB.
- 2-amino-4-méthoxybenzothiazole (4OMe-ABT), Aldrich, >97%.
- 2-hydroxybenzothiazole (OBT), Aldrich, 98%.
- acétonitrile, Acros, HPLC grade.
- acide bromhydrique, Fluka AG, minimum 54%.
- acide chlorhydrique, Acros, minimum 32%.
- acide iminodiacétique (IDA), Aldrich, >99%.
- acide nitrilotriacétique (NTA), Aldrich, >99%.
- acide sulfurique 1N, Merck, 99%.
- benzoquinone, Aldrich, 98%.
- benzothiazole (BT), Aldrich, >97%.
- chlorobenzène (PhCl), Fluka, >99,5%.
- éthanol, Carlo Erba, 96%.
- glycine (Gly), Fluka, >99%.
- hydroxyde de sodium 1N, Merck, 99%.
- hydroxyde de sodium, Prolabo, >97%.
- eau deutérée, D - 99,8%, Euriso-top.
- perchlorate de fer(III) nonahydraté ($\text{Fe}(\text{ClO}_4)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$), Fluka, >97%.
- thiourée, Sigma-Aldrich, 99%.
- triméthylsilylpropionate de sodium tétradeutééré, (TSPd₄), D – 99,8, Euriso-top.
- Trypcase-Soja, bioMérieux.

pour les dosages chimiques :

- 1,10-phénanthroline, Fluka, >99%.
- acétate d'ammonium, Aldrich, >98%.
- acétate de sodium, Prolabo, >99%.
- ammoniac, Merck, minimum 25% dans l'eau.
- chlorhydrate d'hydroxylamine, Aldrich, >99%.
- sel de Mohr, $\text{FeSO}_4 \cdot (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Aldrich, 99%.

- sel de sodium de l'acide 3-(2-pyridyl)-5,6-diphényl-1,2,4-triazine-4,4'-disulfonique (ferrocine), Aldrich, 97%.

IV.2 PREPARATION DES SOLUTIONS

Toutes les solutions ont été préparées avec de l'eau ultra-pure (Millipore α Q, résistivité = 18,2 M Ω cm). Le pH des solutions a été mesuré avec un pH-mètre Orion ou Mettler Toledo MP 225 équipé d'une électrode combinée. La précision des mesures est de l'ordre de 0,1 unité. Pour ajuster le pH à des valeurs précises, nous avons utilisé de l'acide chlorhydrique HCl 1N ou de la soude NaOH 1N. La force ionique des solutions n'a pas été contrôlée.

IV.2.1 Solutions des xénobiotiques pour l'incubation

Les solutions ont été préparées par dissolution de la quantité nécessaire du xénobiotique dans l'eau minérale Volvic[®] afin d'obtenir les concentrations suivantes dans 250 mL:

- BT 2 mM (55 μ L)
- ABT 1 mM (0,0376 g) et 2 mM (0,0752 g)
- 6OH-ABT 0,2 mM (0,0083 g)

Remarque : La concentration en xénobiotique de la solution préparée est deux fois plus concentrée par rapport à la concentration finale utilisée pour l'incubation.

IV.2.2 Solution du complexe FeNTA (2 mM)

La solution du complexe FeNTA est obtenue de la façon suivante :

A une solution aqueuse de 100 ml de NTA 4 mM (0,0765 g) à pH=4,0 sont ajoutés sous agitation 100 ml d'une solution de Fe(ClO₄)₃ 4 mM (0,2066 g de Fe(ClO₄)₃·9H₂O). Le rapport stœchiométrique entre le Fe(III) et NTA est de (1:1). Ce mélange est agité pendant 1 h, le pH est ajusté jusqu'à 4,0 avec de la soude NaOH 1 N. La complexation est suivie par spectrométrie UV-vis à 260 nm (ϵ =6000 M⁻¹ cm⁻¹ à pH=4,0).

Remarque : Avant de commencer l'expérience le pH du complexe est ajusté à 7,0. La préparation du complexe est faite à l'abri de la lumière.

Les solutions de FeNTA de concentrations 6 mM et 10 mM ont été préparées de manière similaire. Les concentrations plus faibles ont été préparées par dilution de la solution mère avec de l'eau minérale Volvic[®].

IV.2.3 Solutions pour les dosages

Solution de chlorhydrate d'hydroxylamine (3 M)

La solution de chlorhydrate d'hydroxylamine a été préparée par dissolution de 104,25 g de ce sel dans 200 mL d'acide chlorhydrique 32%, puis en complétant à 500 mL avec de l'eau. Un léger chauffage de la solution, sous agitation, a été parfois nécessaire pour l'obtention d'une complète dissolution.

Tampon acétate d'ammonium

Le tampon acétate d'ammonium a été préparé par dissolution de 192,7 g d'acétate d'ammonium dans 200 mL d'eau ; puis après addition de 170 mL d'ammoniac à 25%, nous avons complété à 500 mL avec de l'eau. Un léger chauffage de la solution, sous agitation, peut également être nécessaire pour obtenir une complète dissolution.

Solution de ferrocine :

La solution a été préparée par dissolution de 0,9849 g du sel de sodium de l'acide 3-(2-pyridyl)-5,6-diphényl-1,2,4-triazine-4,4'-disulfonique dans 100 mL d'eau. La solution conservée à 6°C est stable pendant 30 jours dans ces conditions.

Solution de 1,10-phénanthroline :

La solution a été préparée par dissolution de 0,5 g de 1,10-phénanthroline dans 500 mL d'eau.

IV.3 REACTEUR

Les études de dégradation ont été réalisées dans un incubateur ou « photo-bioréacteur » (**Figure IV.1**). Le « photo-bioréacteur » est composé de 7 tubes fluorescents (1) de 15 W TLAD Philips®, qui émettent entre 300-400 nm avec un maximum d'émission à 365 nm. La température du réacteur aux parois thermoisolantes (4) est maintenue par une lampe infra rouge (2) et un ventilateur (3) couplés à un thermocouple (non indiqué sur la figure). La température est périodiquement vérifiée par un thermomètre numérique (6). Les Erlenmeyers transparents ou opaques (7) sont fixés sur la table d'agitation (5), pour assurer l'oxygénation et l'homogénéité du milieu.

L'intensité du flux lumineux du système d'irradiation est mesuré et vérifié avant chaque manipulation avec un luxmètre Testo 545.



Figure IV.1 : Photo-bioréacteur

IV.4 CONDITIONS DE CULTURE

Nous avons utilisé une souche de *Rhodococcus rhodochrous* (OBT18), qui a été isolée par De Wever *et al.* (1997b ; 1998) à partir de boues activées de stations d'épuration placées en sortie d'usine fabriquant du MBT (BAYER, Anvers, Belgique).

Les bactéries sont conservées sous forme d'aliquot à -80°C en présence de 10 % de glycérol (agent cryoprotecteur). Un aliquot est décongelé et utilisé pour ensemercer 100 mL de milieu TS : Trypcase-Soja (bioMérieux) dans un Erlenmeyer de 500 mL.

Composition du milieu Trypcase-Soja : pour 1 L d'eau distillée

- | | |
|--------------------|----------------------------------|
| ♦ biotrypcase 17 g | ♦ K_2HPO_4 2,5 g |
| ♦ biosoyase 3 g | ♦ KH_2PO_4 2,5 g |
| ♦ NaCl 5 g | |

Cette préculture est agitée à 30°C et à 200 rpm (rotations par minute) pendant 48 h pour une oxygénation convenable des microorganismes.

Méthode A. Après 48 h de préculture, 2 mL de préculture sont ajoutés dans 100 mL de milieu TS (Erlenmeyer de 500 mL). La croissance des microorganismes se déroule pendant 24 h sur table d'agitation à 30°C et à 200 rpm. Ces conditions ont été préalablement établies pour que la croissance des bactéries soit arrêtée en fin de phase exponentielle.

Méthode B. La méthode **B** est similaire à la **Méthode A** mais on ajoute 6 mL de FeNTA 2mM filtré ($0,2\ \mu\text{m}$) à 100 mL de milieu TS contenant 2 mL de préculture.

Remarque : Des essais ont été réalisés avec des cellules cultivées sous irradiation à 365 nm selon les **Méthodes A et B**.

IV.5 CONDITIONS DE PHOTO ET DE BIODEGRADATION

IV.5.1 Dégradation des xénobiotiques photoinduite par des sels ferriques ou FeNTA

A une solution du xénobiotique est ajoutée une solution de FeNTA dans des Erlenmeyers de 500 mL, fermés avec des bouchons de coton, afin d'obtenir 100 ml de mélange.

Nous avons travaillé avec une concentration en :

- ABT 0,5 mM (FeNTA 1,0 mM) à pH=4,0 et 7,0
- 6OH-ABT 0,1 mM (FeNTA 0,2 et 1,0 mM) à pH=7,0
- BT 1 mM ($\text{Fe}(\text{ClO}_4)_3$ 0,3 mM et 3,0 mM) à pH=3,2 et 7,5
- BT 1 mM (FeNTA 0,3 mM et 3,0 mM) à pH=7,5

Pour chaque expérience, nous avons réalisé systématiquement en parallèle deux types de témoin :

- le témoin xénobiotique en absence de fer (sel de fer ou FeNTA) (mise en évidence des photoproduits obtenus par photolyse directe).
- le témoin xénobiotique sans lumière dans des Erlenmeyers en verre borosilicaté opaques à la lumière UV et visible (mise en évidence d'une éventuelle transformation chimique ou physique).

Les Erlenmeyers sont ensuite placés sur table d'agitation à 30°C et 200 rpm. Des prélèvements de 1×3 mL (pour les dosages et analyses par HPLC et RMN) sont effectués régulièrement pour suivre la cinétique de dégradation. Un dosage du fer est immédiatement réalisé sur un des échantillons, les autres échantillons sont congelés jusqu'au moment des analyses.

Remarque : Pour les études en absence de lumière, les mélanges sont placés dans des Erlenmeyers en verre borosilicaté opaques à la lumière UV et visible.

IV.5.2 Dégradation des xénobiotiques par *Rhodococcus rhodochrous* (OBT18)

IV.5.2.1 Méthode générale

Après 24 h de culture (**Méthode A ou B**), les cellules sont centrifugées à 8000 rpm pendant 15 min à 5°C (300 mL de culture pour ABT et 20 mL pour BT). Le surnageant est éliminé et le culot bactérien est lavé une fois avec une solution de NaCl 0,8% et une fois avec de l'eau minérale Volvic®.

Les culots cellulaires sont ensuite remis en suspension dans un volume final de 100 mL dans des Erlenmeyers de 500 mL.

Pour un litre de culture de *Rhodococcus rhodochrous* (OBT18), environ 14-15 g de biomasse humide sont récupérés.

Les Erlenmeyers sont ensuite placés sur la table d'agitation du photo-bioréacteur à 30°C et 200 rpm. Des prélèvements de 1×3 mL (pour les dosages et analyses par HPLC et RMN) sont effectués régulièrement pour suivre la cinétique de dégradation. Ils sont centrifugés à 12500 rpm pendant 3 min. Le surnageant est séparé du culot puis congelé jusqu'au moment des analyses.

Remarque : Pour les études en absence de lumière, les mélanges sont placés dans des Erlenmeyers en verre borosilicaté opaques à la lumière UV et visible.

IV.5.2.2 Cas des cellules en absence de fer

Nous avons travaillé avec des concentrations en :

- ABT 0,5 mM à pH=7,0
- BT 1 mM à pH=7,0

Pour chaque expérience, nous avons réalisé systématiquement en parallèle deux témoins:

- le témoin « cellules » consistant en un Erlenmeyer contenant les cellules à l'obscurité
- le témoin « cellules + lumière » consistant en un Erlenmeyer contenant les cellules à la lumière (mise en évidence des éventuels métabolites excrétés par les cellules).

IV.5.2.3 Cas de cellules en présence de sels ferriques ou de FeNTA

Nous avons travaillé avec des concentrations en :

- ABT 0,5 mM (FeNTA 0,1 mM ; 0,25 mM ; 0,5 mM ou 1,0 mM)
- ABT 1,0 mM (FeNTA 1,0 mM)
- 6OH-ABT 0,1 mM (FeNTA 1,0 mM)
- BT 1 mM (Fe(ClO₄)₃ 0,3 mM et 3,0 mM) à pH=6,2 et 7,5
- BT 1,0 mM (FeNTA 0,3 mM et 3,0 mM)

Pour chaque expérience, nous avons réalisé systématiquement en parallèle trois témoins :

- le témoin « cellules » consistant en un Erlenmeyer contenant les cellules à l'obscurité
- le témoin « cellules + lumière » consistant en un Erlenmeyer contenant les cellules à la lumière (mise en évidence des éventuels métabolites excrétés par les cellules).

- le témoin « cellules + fer » consistant en un Erlenmeyer contenant les cellules et FeNTA 1,0 mM (mise en évidence du devenir du complexe de fer en présence des cellules).

IV.5.3 Incubation de *Rhodococcus rhodochrous* (OBT18) en présence d'ABT et de FeNTA – Mise en évidence des différents métabolites

Quatre Erlenmeyers (en verre borosilicaté opaques à la lumière UV et visible) préparés suivant la méthode générale décrite précédemment sont placés sur la table d'agitation à 30°C et à 200 rpm. Un des Erlenmeyers est utilisé pour suivre l'évolution de la biodégradation comme décrit précédemment. Lorsque le métabolite d'intérêt est en concentration la plus élevée, les contenus de deux Erlenmeyers sont rassemblés et centrifugés à 8000 rpm et 5° C pendant 15 min. Le surnageant (200 mL) est congelé et lyophilisé. Le lyophilisat est repris dans 20 mL de D₂O, lyophilisé à nouveau et repris dans 10 mL de D₂O. En parallèle, un Erlenmeyer est centrifugé à 8000 rpm et 5° C pendant 15 min, le surnageant (100 mL) est congelé jusqu'au moment du traitement par SPE (Solid Phase Extraction) comme décrit dans la **Figure IV.2**. La cartouche Oasis[®] HLB est dans un premier temps conditionnée avec du méthanol et de l'eau pour activer sa phase composée de silice greffée avec des molécules C₁₈. Parallèlement 10 mL de surnageant sont filtrés à 0,22 µm (Solution 1). Ces 10 mL sont ensuite injectés à travers la cartouche (Solution 2). La phase de la cartouche est alors lavée avec 4 mL d'eau milliQ (Solution 3) et les produits retenus dans la cartouche sont élués avec 4 mL de méthanol (Solution 4). Une analyse par HPLC ainsi qu'un dosage du fer sont effectués pour ces 4 solutions. Pour l'analyse RMN de la solution 4, une évaporation complète du méthanol sous vide est alors réalisée. L'extrait sec est alors redissous dans un mélange de méthanol et d'eau deutérée afin de favoriser la dissolution.

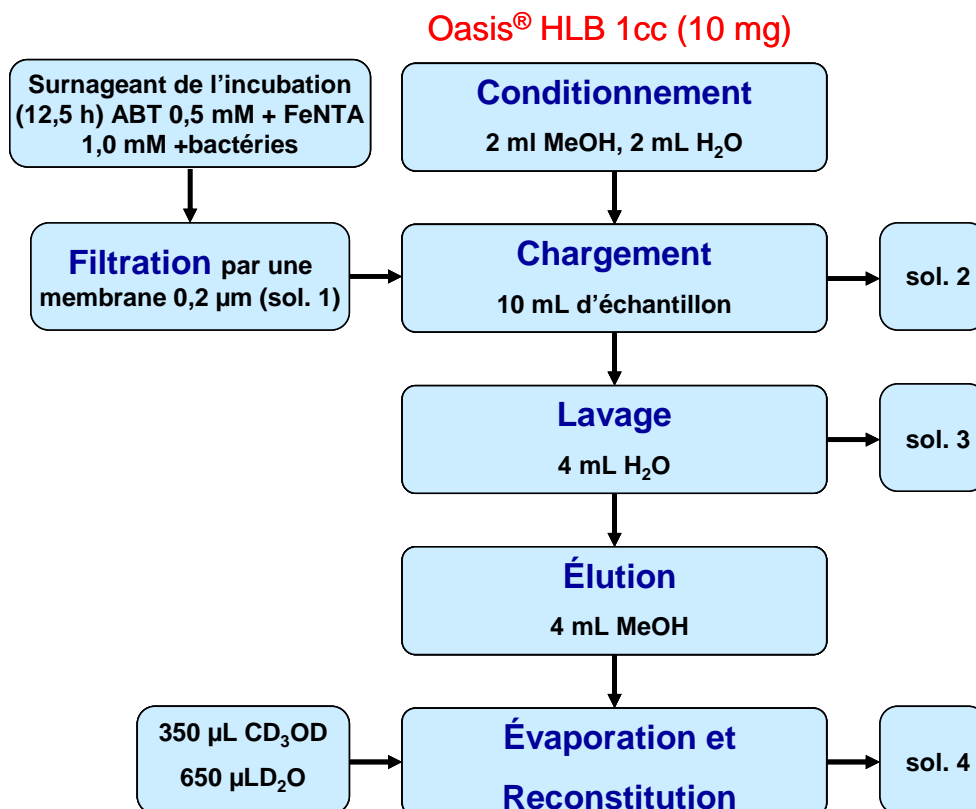


Figure IV.2 : Protocole SPE utilisé pour concentrer et identifier les métabolites d'ABT.

IV.6 METHODES D'ANALYSE

IV.6.1 Méthode spectroscopique

IV.6.1.1 Spectroscopie d'absorption UV-visible

Les spectres d'absorption UV-visible des solutions ont été enregistrés sur des spectrophotomètres Cary 3 ou 13 à double faisceau parallèle informatisés pour la mémorisation et le retraitement des spectres. La précision de l'appareil est de $\pm 0,002$ de densité optique.

IV.6.1.2 Spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire

Les spectres RMN ont été enregistrés sur un spectromètre RMN Bruker Avance 500 avec une sonde inverse triple accord ^1H - ^{13}C - ^{15}N équipée d'une bobine de gradient sur l'axe z, à 25°C dans des tubes de 5 mm de diamètre.

Préparation générale des échantillons pour suivre la dégradation par RMN du proton

Pour la préparation des échantillons, on utilise 540 μL de surnageant auquel on ajoute 60 μL d'une solution de triméthylsilylpropionate de sodium tétradeutéié (TSPd₄) à 5 mM dans D₂O. L'eau lourde est utilisée pour rechercher le signal de lock et pour le réglage de l'homogénéité du champ magnétique. Le TSPd₄ constitue à la fois une référence pour l'échelle des déplacements chimiques, car ses 9 protons résonnent à 0 ppm sous forme d'un singulet, et pour la quantification des produits (étalon interne). Dans ces échantillons, le pH n'est pas ajusté.

Précipitation du fer pour l'analyse par RMN du proton

Afin de pouvoir analyser correctement les signaux de glycine, IDA et NTA, le protocole suivant de précipitation du fer a été mis en place : 440 μL de surnageant sont mélangés avec 60 μL de TSPd₄ et 100 μL de NaOH 1 M, pour amener la solution à pH 13 afin de précipiter le fer. Après 1h30, l'échantillon est centrifugé à 12500 rpm pendant 3 min. 550 μL de ce surnageant sont neutralisés à pH environ 7 avec de l'acide chlorhydrique 1 M et 0,01 M (92 μL de HCl 1 M).

Acquisitions

La séquence choisie pour les acquisitions sur le spectromètre 500 MHz, est une présaturation utilisant deux impulsions sélectives de phases opposées. Elle permet d'obtenir un bon rapport signal sur bruit.

Les paramètres d'acquisition pour l'analyse d'échantillons liquides sont les suivants :

- Impulsion ¹H de 90° : 6,3 μs
- Impulsion sélective : 3 s (utilisée pour la suppression de la résonance de l'eau)
- Délai de relaxation : 1 s
- Durée d'acquisition : 4,67 s
- Nombre de points : 65 536
- Nombre de scans : 128
- Fenêtre spectrale : 7 002 Hz
- Nombre de scans factices : 4
- Durée de la séquence : 18 min (pour 128 scans).

Quantification des métabolites

La quantification en RMN s'établit simplement : les concentrations en xénobiotique ([m]) sont proportionnelles à la valeur d'intégration de chaque pic. Le pic du TSPd₄ a une aire qui correspond à 9 protons et à une concentration de 0,5 mM (**Figure IV.3**).

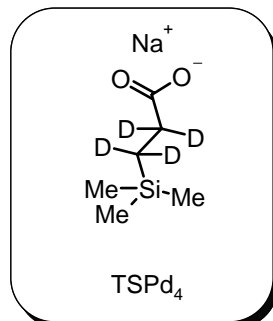


Figure IV.3 : Structure du TSPd₄.

D'après la formule suivante, et connaissant le nombre de protons qui correspond à chaque signal, nous pouvons en déduire la concentration du xénobiotique.

$$[m] = \frac{9A_0 \times [\text{ref}]}{b \times A_{\text{ref}}} \times \text{facteur de dilution du surnageant}$$

- avec : [m] = concentration du xénobiotique m
- A₀ = intégrale d'un signal du xénobiotique m
- [ref] = concentration de la référence TSPd₄ (0,5 mM)
- A_{ref} = intégrale du signal du TSPd₄
- b = nombre de protons dans le signal du xénobiotique m intégré
- 9 = nombre de protons résonnant à 0 ppm (TSPd₄)
- facteur de dilution du surnageant après ajout du TSPd₄ = 1,1

IV.6.2 Méthodes chromatographiques

IV.6.2.1 Chromatographie Liquide Haute Performance

Par cette méthode ont pu être évaluées quantitativement la disparition des benzothiazoles étudiés et la formation des produits de dégradation. Les analyses HPLC ont été réalisées sur un appareil Waters muni d'un détecteur d'adsorption UV-visible à barrette de diodes (type 996), d'un passeur d'échantillon (type 717) et de deux pompes (type 510). L'ensemble est piloté par un ordinateur muni du logiciel Millennium.

Les analyses ont été effectuées avec des colonnes phase inverse Interchrom Nucléosil pour ABT, 5 μm (C8, 250 x 4,6 mm) et pour BT, 5 μm (C18, 250 x 4,6 mm) équipées d'une précolonne de phase similaire.

Les séparations ont été effectuées en utilisant deux modes opératoires:

Conditions Isocratiques

Pour ABT, l'éluant est un mélange H_2O (A)/ ACN (B) 75/25 v/v; débit 1 mL min^{-1} . Le volume d'échantillon injecté est de 10 μL . Les chromatogrammes ont été enregistrés à des longueurs d'onde entre 200 et 400 nm, mais pour la quantification, nous avons travaillé à 265 nm. Le temps d'analyse pour chaque injection est de 30 minutes.

Pour l'analyse de BT, l'éluant est un mélange H_2O (A)/ ACN (B) 80/20 v/v; débit 1 mL min^{-1} . Le volume d'échantillon injecté est de 20 μL . Les chromatogrammes ont été enregistrés pour la quantification à 295 nm. Le temps d'analyse pour chaque injection est de 40 minutes.

Conditions Gradient (ABT)

Le gradient d'élution est programmé de 25% de B à 0 min jusqu'à 75% de B à 12 min, puis un retour à 25% de B en 1 min maintenu jusqu'à la fin de l'analyse qui dure au total 15 min avec un débit de 1 mL min^{-1} . Le délai d'attente programmé pour la mesure HPLC suivante est de 5 min. Le volume d'échantillon injecté est de 10 μL .

La précision de la méthode est évaluée à $\pm 5\%$; les injections sont en général effectuées deux fois.

III.6.2.2 Chromatographie Liquide Haute Performance couplée à la Spectrométrie de Masse (LC-MS)

Instrumentation

L'appareil HPLC utilisé est un Waters Alliance 2695, détecteur DAD 996. Le système est couplé à un spectromètre de masse Waters/ Micro QTOF équipé d'une source électrospray.

Mode opératoire

La séparation des métabolites est réalisée en utilisant la chromatographie phase inverse avec une colonne Xtena MS C₁₈ (100x2,1x3,5 μm), avec un mélange de solvants éluant A (H_2O , 1‰ AcOH) / éluant B (ACN) à un débit de 0,25 mL/min. Le gradient d'élution est programmé de 5 % de B à 0 min jusqu'à 90 % de B à 15 min, maintenu pendant

5 min, puis un retour à 5 % de B en 3 min, suivi d'un temps d'équilibration de 9 min avant l'analyse suivante.

La séparation est suivie par détecteur UV-visible avec un DAD entre 200 et 400 nm et un détecteur de masse avec QTOF ES⁺ ($V_{\text{cap.}}=3\text{kV}$, $T_{\text{solv.}} = 120^\circ\text{C}$; $T_{\text{desolv.}}=400^\circ\text{C}$; 0-1000 m/z)

IV.6.3 Méthodes de dosages

IV.6.3.1 Dosage du Fe(II)

Méthode avec la 1,10-phénanthroline

Lors de l'irradiation de solutions contenant des espèces de Fe(III), il y a formation de Fe(II). Pour le dosage de Fe(II), nous avons utilisé une méthode basée sur la formation sélective d'un complexe entre le Fe(II) et la 1,10-phénanthroline (**Figure IV.4**), complexe dont le coefficient d'absorption molaire à 510 nm est égal à $\epsilon = 11180 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$.

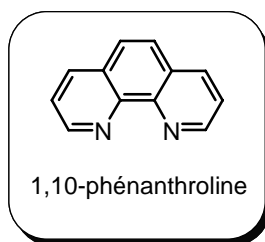


Figure IV.4 : Structure chimique de la 1,10-phénanthroline.

Le principe de ce dosage est le suivant : après photo- ou biodégradation d'un volume V_1 d'une solution contenant des complexes de fer pendant un temps t (exprimé en heure), nous avons ajouté à un volume V_2 (0,25 mL) de cette solution, 1 mL de tampon acétate et 0,5 mL de 1,10-phénanthroline à 0,1% en masse. La solution est ensuite complétée avec de l'eau jusqu'à 10 mL (V_3). Après agitation, ce mélange est alors laissé à l'obscurité pendant une heure avant la lecture de sa densité optique à 510 nm dans une cellule de trajet optique ℓ . La concentration de Fe(II) a été calculée à partir de cette relation :

$$[Fe(II)] = \frac{(\text{DO}_{\text{solution}} - \text{DO}_{\text{blanc}})_{510} \times V_3}{\ell \times \epsilon_{\text{Fe(phenanthroline)}^{2+}} \times V_2}$$

Pour l'étalonnage du dosage de Fe(II), nous avons préparé des solutions étalons à partir de solution de $\text{FeSO}_4.(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ à $1,6.10^{-4} \text{ M}$ (**Figure IV.5**)

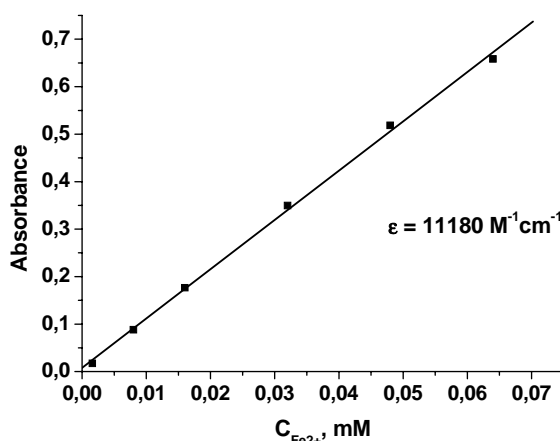


Figure IV.5 : Droite d'étalonnage pour le dosage du Fe(II).

IV.6.3.2 Dosage du fer total

Méthode avec la ferrocine

La mesure du fer total a lieu après réduction des espèces de Fe(III) en solution, en présence de chlorhydrate d'hydroxylamine (3 M). La ferrocine est un puissant agent complexant du Fe(II), qui permet de doser le fer dans les eaux naturelles, en formant instantanément un complexe stable de couleur magenta très soluble dans l'eau.

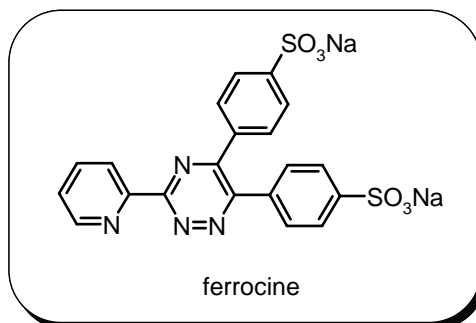


Figure IV.6 : Structure de la ferrocine.

La complexation du Fe(II) par la ferrocine (**Figure IV.6**) est très rapide $k = 3.10^{11} \text{ L.mol}^{-1}.\text{s}^{-1}$ et la limite de détection peut atteindre $0,1 \text{ nmol.L}^{-1}$. Ce dosage avec la ferrocine est applicable seulement pour des pH compris entre 4 et 8 où le complexe formé Fe(II)-Ferrocine est stable.

Le spectre d'absorption UV-visible du complexe ferreux avec la ferrocine présente un maximum à 562 nm. Le coefficient d'absorption molaire à cette longueur d'onde est égal à $\epsilon = 26500 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ (**Figure IV.7**):

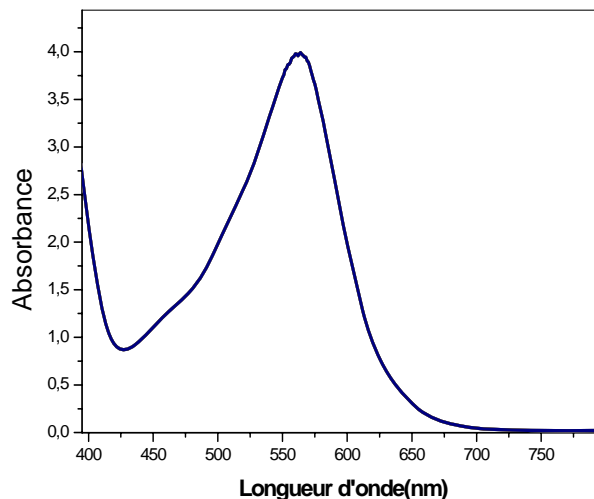


Figure IV.7 : Spectre d'absorption UV-visible du complexe Fe(II)-Ferrocine .

Le protocole de dosage a été proposé par Stookey (1970) et a été adapté à nos conditions de travail. Cette méthode est basée sur la formation rapide du complexe entre le Fe(II) et la ferrocine. La détermination du fer total présent en solution passe par la lecture de la densité optique à 562 nm. Il faut mesurer l'absorbance immédiatement après avoir fini d'ajouter les réactifs, car le complexe formé avec la ferrocine n'est stable que pendant une vingtaine de minutes, par la suite la densité optique varie et fausse donc nos mesures.

Le protocole que nous avons utilisé pour réaliser ce dosage est le suivant : dans une fiole de volume V_1 5 mL, nous avons placé une volume V_2 0,25 mL d'échantillon, puis 1,5 mL d'eau et 0,5 mL de chlorhydrate d'hydroxylamine. Après agitation du mélange suivi de 10 min d'attente, nous avons ensuite ajouté 0,5 mL de ferrocine (0,02 M), 1 mL de tampon acétate d'ammonium et complété à 5 mL avec de l'eau. Dans ces conditions la concentration maximale de fer que l'on peut doser est de $6,3 \times 10^{-3} \text{ M}$.

Après agitation de ce mélange, la densité optique de la solution à 562 nm est lue dans une cellule de trajet optique ℓ , et la concentration en fer total est obtenue en appliquant le calcul suivant :

$$[Fe(total)] = \frac{(DO_{\text{solution}} - DO_{\text{blanc}})_{562} \times V_1}{\ell \times \epsilon_{\text{Fe(ferrocine)}2+} \times V_2}$$

Bien que la ferrocine soit aussi un complexant pour d'autres ions métalliques (cuivre, cobalt), nous pouvons négliger ces interférences car dans notre cas, ces ions ne sont pas présents.

Pour l'étalonnage du dosage du fer total, nous avons préparé des solutions étalons à partir de solution de $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_3$ à $8,1 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ (**Figure IV.8**).

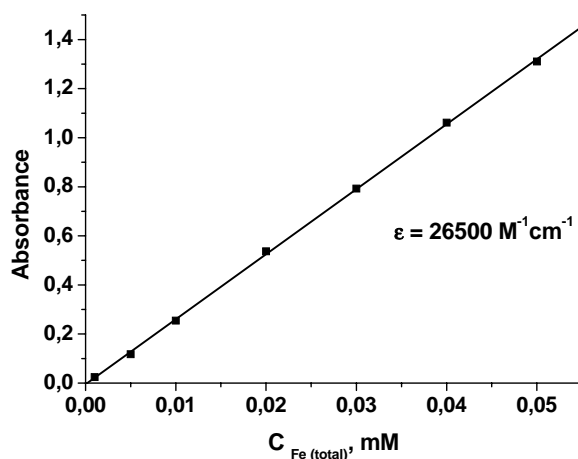


Figure IV.8 : Droite d'étalonnage pour le dosage du fer total.

IV.6.3.3. Dosages du carbone organique total dissous (TOC)

Les mesures du carbone organique total dissous ont été réalisées à l'aide d'un analyseur Shimadzu TOC 5050A permettant de suivre la concentration en carbone au cours des processus de dégradation.

Les échantillons ont été dilués 5 fois avec de l'eau ultra pure, puis analysés.

Les valeurs de TOC sont obtenues par soustraction du Carbone Inorganique (IC) au Carbone Total (TC) ; le TC correspond à tout le carbone présent en solution et les atomes de carbone sous forme de carbonates et d'hydrogénocarbonates correspondent à l'IC. Les analyses ont été effectuées trois fois, la valeur moyenne est annoncée avec un écart inférieur ou égal à $\pm 0,5 \text{ mg L}^{-1}$. La limite de détection est de $50 \mu\text{g L}^{-1}$ et on peut mesurer jusqu'à 4000 mg L^{-1} en concentration de carbone.

Mesure du TC (Carbone Total)

Le carbone se trouvant dans l'échantillon est transformé en CO_2 dans un tube à combustion (690°C) en présence d'un catalyseur d'oxydation (billes d'alumine recouvertes de platine) qui assure une conversion totale des atomes de carbone de l'échantillon en CO_2 . Un flux d'air ultra pur entraîne le CO_2 formé vers la cellule de détecteur NDIR (décrite par la suite). La quantification de carbone total dépend d'un étalonnage fait au préalable dans la gamme de concentrations adéquate.

Mesure de l'IC (Carbone Inorganique)

Le carbone inorganique de l'échantillon est transformé en CO_2 , après réaction dans une solution d'acide phosphorique à 25%. Par bullage d'air ultra pur dans la solution d'acide phosphorique, le CO_2 formé est entraîné dans la même cellule NDIR que pour le TC. La concentration en IC se détermine de la même façon que celle en TC.

Système de détection du CO_2

La détection du CO_2 formé se fait dans la cellule NDIR (Non Dispersif Infra-Red gaz). Dans cette cellule, une source émet des radiations infrarouge ($\lambda = 4,3 \mu\text{m}$) dans deux cavités (échantillon et référence). La cavité de l'échantillon est balayée par l'air chargé en CO_2 provenant de l'échantillon. La cavité référence, scellée, est remplie d'argon. Le passage de CO_2 dans la cavité absorbe de l'énergie, il se crée donc un déséquilibre de température et donc de pression entre les deux cavités d'où une déflexion du diaphragme métallique qui sépare les deux cavités. La mesure de cette déflexion est proportionnelle à la quantité de CO_2 .

La quantification de TC et IC dépend d'un étalonnage préalable (**Figure IV.9**). La préparation des solutions standards a été réalisée de la manière suivante : pour le TC nous avons dissous 2,125 g d'hydrogénophthalate de potassium dans 1 L d'eau pure. La solution résultante contient 1000 mg de carbone L^{-1} . Pour le IC, des masses de 3,5 g de bicarbonate de sodium et 4,41 g de carbonate de sodium sont dissoutes dans 1 L d'eau pure. La solution résultante contient 1000 mg de carbone L^{-1} .

Les droites d'étalonnage réalisées ont des concentrations comprises entre 0 et 62,2 mg L^{-1} pour le carbone total et pour le carbone inorganique.

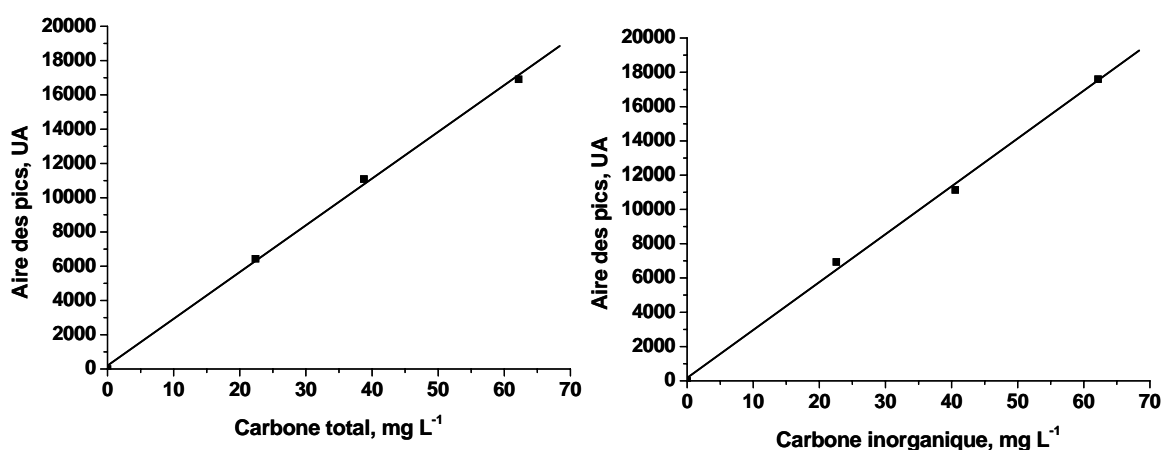


Figure IV.9 : Droites d'étalonnages de TC et IC.

IV.6.4 Analyse de la distribution du fer dans les différents compartiments intra et extra-cellulaires

A la fin de l'incubation (150 h) en présence de FeNTA (1 mM) et d'ABT (0,5 mM) avec et sans lumière, 30 mL de la suspension cellulaire sont prélevés et sont traités suivant le protocole décrit dans la *Figure IV.10*.

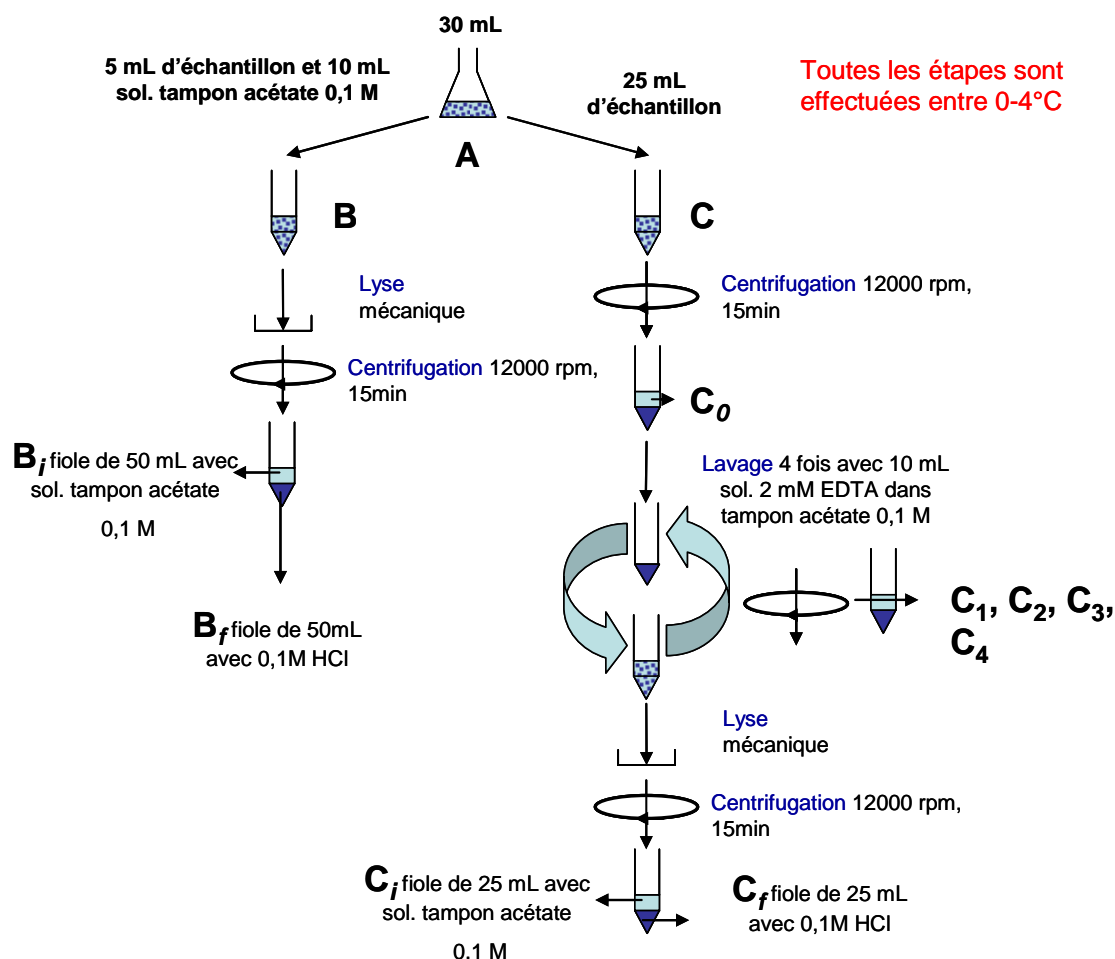


Figure IV.10 : Protocole utilisé pour doser le fer dans les différents compartiments intra- et extra-cellulaires.

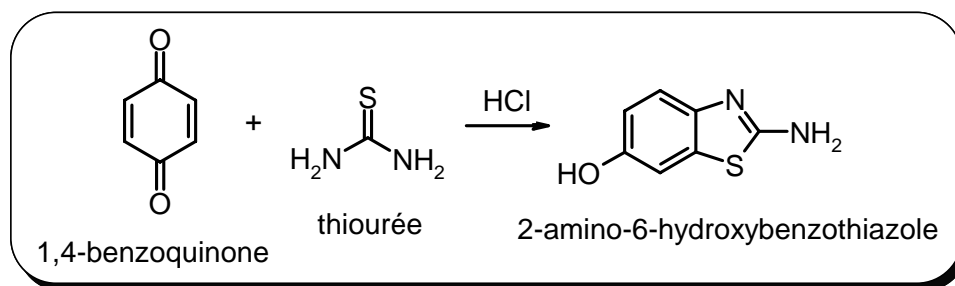
Les 30 mL de suspension cellulaire sont partagés en deux fractions : 5 mL pour le traitement par la voie **B** et 25 mL pour celui de la voie **C**. Pour la voie **B**, une pression de 2 kBar est appliquée sur les 5 mL de suspension cellulaire. Cette étape permet de casser les cellules. Les 5 mL sont ensuite centrifugés et le fer est dosé à la fois dans le surnageant (B_i) et dans le culot (B_f) après dilution dans des fioles de 50 mL. Pour la voie **C**, les 25 mL sont tout d'abord centrifugés et le fer est dosé dans le surnageant (C₀). Le culot bactérien est quant à lui mis en présence de 10 mL de solution d'EDTA (2 mM) réalisée dans un tampon acétate. Après mise en suspension des bactéries, la nouvelle suspension cellulaire est centrifugée et le

fer est dosé dans le surnageant (C_1). Cette étape de lavage à l'EDTA est répétée 4 fois (C_1 , C_2 , C_3 et C_4). Après le dernier lavage à l'EDTA, le culot bactérien est remis en suspension dans 10 mL de tampon acétate et une pression de 2 kBar est appliquée. Une fois les cellules cassées, le mélange est centrifugé et le fer est alors dosé dans le surnageant (C_i) et dans le culot (C_f) après dilution dans des fioles de 25 mL. Ce protocole nous permet de doser le fer en solution, adsorbé sur les cellules et intégré dans les cellules.

IV.7 SYNTHESSES DU 6OH-ABT ET 4OH-ABT

IV.7.1 Synthèse du 6OH-ABT

La méthode de synthèse utilisée est adaptée de la publication de Lau et Gompf (1970) :



1,9 g (0,025 mol) de thiourée sont dissous dans 50 ml d'éthanol et 3 ml d'HCl (conc. 37%). Parallèlement, 100 ml d'une solution éthanolique de 5,4 g (0,05 mol) de 1,4-benzoquinone sont préparés. Cette solution est chauffée puis ajoutée goutte à goutte sous agitation dans la solution de thiourée. Au début de l'addition, le milieu se décolore, mais à la fin, le mélange devient rouge.

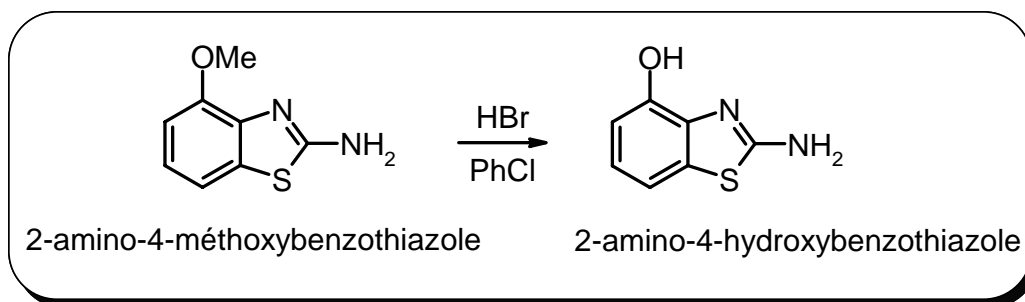
Après 24 h d'agitation à température ambiante, le solvant est éliminé avec un évaporateur rotatif. Le résidu obtenu est traité avec de l'acétonitrile brûlant, puis filtré sous vide et lavé avec de petites quantités d'éthanol froid. Le chlorhydrate de 6OH-ABT de couleur blanc-rose est séché. Le solide est ensuite dissous dans une quantité minimale d'eau, filtré, puis reprecipité avec de l'acide chlorhydrique concentré. La masse du sel blanc récupéré est de 2,84 g (56%) p.f.= 263-265°C.

L'élimination de la base libre se fait par dissolution du sel dans l'eau et neutralisation avec une solution d'acétate de sodium 4%. Le 6OH-ABT est recristallisé dans un mélange éthanol-eau jusqu'à 98% de pureté, 0,98 g (p.f.= 249-251°C).

RMN ^1H : (500 MHz, H_2O 10% D_2O , TSPd₄) δ (ppm): 6,87 (dd, $^3\text{J} = 8,4$ Hz, $^4\text{J} = 2,2$ Hz, 1H); 7,18 (d, $^4\text{J} = 2,2$ Hz, 1H); 7,31 (d, $^3\text{J} = 8,4$ Hz, 1H).

IV.7.2 Synthèse du 4OH-ABT

La méthode de synthèse du 4OH-ABT est inspirée de la publication de Vel'tman et Yanovskii (1955) :



Une solution de 1,35 g (0,0075 mol) de 2-amino-4-méthoxybenzothiazole, dans 3 ml de chlorobenzène et 0,3 ml d'HBr 47% est mise à reflux pendant 8 heures. Après refroidissement, ce mélange est filtré et le solide blanc obtenu est séché. Par la suite, il est redissous dans une quantité minime d'eau et filtré à nouveau. Le filtrat est traité avec NaHCO_3 et un précipité blanc se forme. Ce nouveau précipité est filtré puis recristallisé dans l'eau. La masse brute de 4OH-ABT est 0,19 g (15%). Le produit de synthèse est recristallisé jusqu'à 98% de pureté (p.f. = 185-186°C).

RMN ^1H : (500 MHz, H_2O 10% D_2O , TSPd₄) δ (ppm): 7,04 (t, $^3\text{J} = 8,0$ Hz, 1H); 7,23 (d, $^3\text{J} = 7,6$ Hz, 1H); 7,83 (d, $^3\text{J} = 7,6$ Hz, 1H).

V

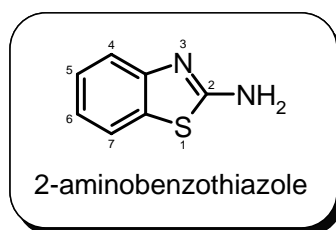
RESULTATS ET DISCUSSION

V.1 PHOTO- ET BIODÉGRADATION DE L'ABT EN MILIEU AQUEUX

Le premier dérivé de la famille des benzothiazoles que nous avons choisi pour cette étude est l'ABT ou 2-aminobenzothiazole. Ce choix a été surtout dicté par le fait que ce composé est connu pour être très peu biodégradable et sa photolyse sous irradiation solaire est également un processus très mineur. En effet, il sera ainsi plus facile de mettre en évidence les effets combinés des deux processus, photo- et biodégradation, ce qui constitue l'objectif principal de cette étude.

V.1.1 Caractéristiques physico-chimiques de l'ABT

La structure chimique du 2-aminobenzothiazole (ABT) est présentée ci-dessous :



L'ABT se présente sous la forme d'une poudre blanche, ses principales caractéristiques physico-chimiques sont présentées dans le **Tableau V.1** :

Formule brute	C ₇ H ₆ N ₂ S
Masse molaire	150,20 g mol ⁻¹
Température de fusion	126-129°C
Température d'ébullition	décomposition
Solubilité dans l'eau	310,3 mg L ⁻¹ à 25° C
pKa	4,2

Tableau V.1 : Propriétés physico-chimiques de l'ABT

Le spectre d'absorption UV-visible de ce composé à pH 7,0 dans l'eau est présenté **Figure V.1**.

On observe deux maxima d'absorption centrés à 220 et 260 nm avec des coefficients d'absorption moléculaire égaux respectivement à 5677 et 2166 M⁻¹ cm⁻¹. Un épaulement situé vers 280 nm est également présent dans le spectre.

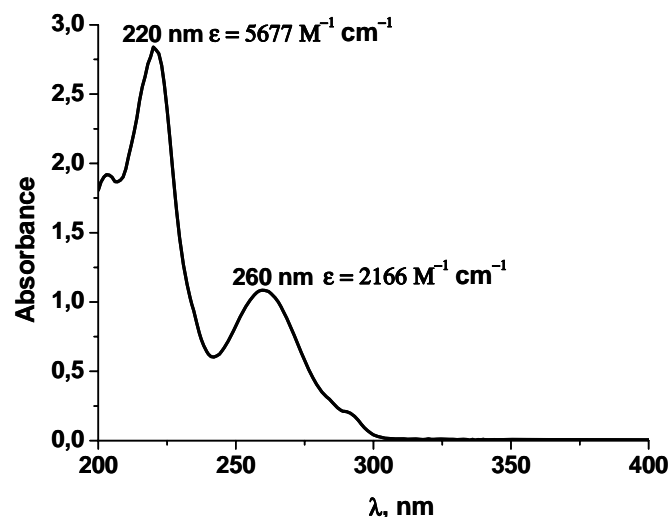


Figure V.1 : Spectre UV-visible d'ABT 0,5 mM dans l'eau, pH = 7,0.

Les différents spectres UV-visible en fonction du pH sont présentés dans la **Figure V.2a**. Le pKa de l'ABT a été évalué d'après la **Figure V.2b**, sa valeur est de 4,2.

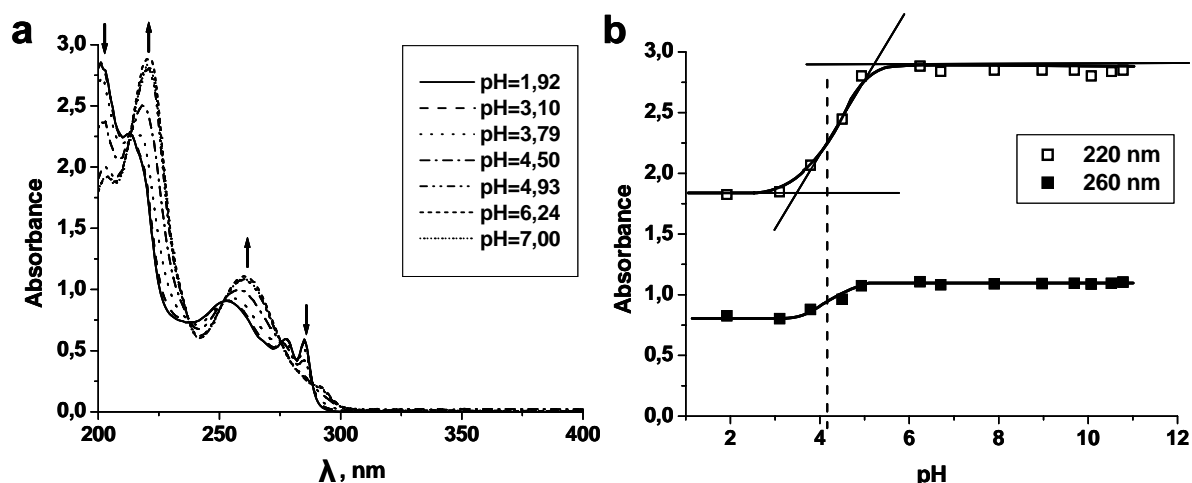


Figure V.2 : a) Spectres UV-visible d'ABT à différents pH, b) Evolution de l'absorbance en fonction du pH à 220 et 260 nm.

V.1.2 Photo- et biodégradation de l'ABT : étude des processus séparés

Nous avons commencé notre travail par une étude des deux processus séparés: d'une part, la dégradation d'ABT par une souche bactérienne *Rhodococcus rhodochrous* OBT18, obtenue dans le cadre d'une collaboration avec H. De Wever et d'autre part, la dégradation d'ABT par irradiation à 365 nm soit directe, soit en présence d'un complexe aminopolycarboxylique de fer, le nitrilotriacétate de Fe(III) (FeNTA). Les différentes expériences ont été réalisées dans un photo-bioréacteur équipé de tubes fluorescents émettant entre 300 et 400 nm (maximum d'émission 365 nm) à 30°C et 200 rpm. Nous avons travaillé avec :

- ABT 0,5 mM + bactéries
- ABT 0,5 mM + lumière
- ABT 0,5 mM + FeNTA 1,0 mM + lumière

Les cinétiques de dégradation d'ABT sont suivies par analyse HPLC en phase inverse des différents prélèvements réalisés au cours du temps. Pour l'expérience en présence de bactéries, les prélèvements sont centrifugés puis les surnageants analysés. Les chromatogrammes HPLC enregistrés aux temps 0 h, 25 h, 75 h et 125 h sont présentés dans la **Figure V.3**. Les chromatogrammes d'ABT en présence de lumière seule n'ont pas variés pendant l'expérience et ne sont donc pas présentés. Ces résultats montrent clairement qu'ABT n'absorbe pas la lumière solaire et ne subit donc pas de photolyse directe.

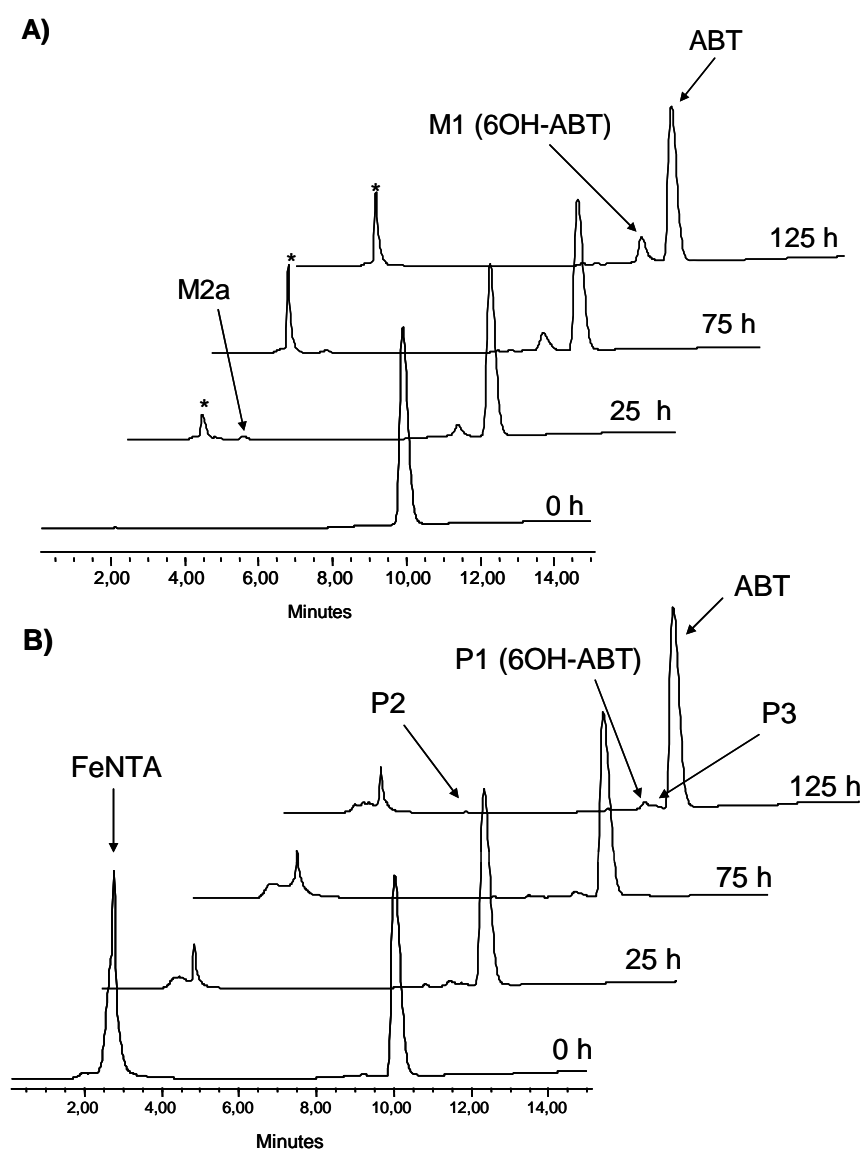
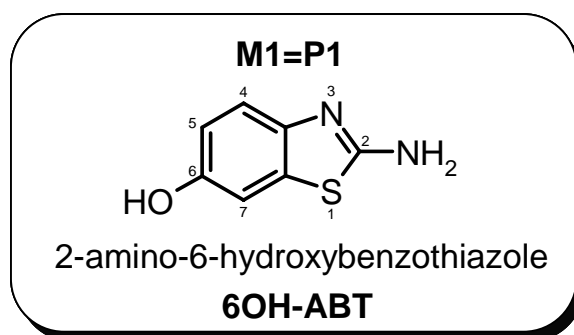


Figure V.3 : Suivi HPLC de la dégradation d'ABT par *Rhodococcus rhodochrous* (A) et par la lumière (365 nm) en présence de FeNTA (B). pH = 7,0. [ABT] = 0,5 mM, [FeNTA] = 1,0 mM. * - métabolites excrétés par les cellules.

Au cours du temps, une diminution de l'aire du pic d'ABT ($t_R = 10,0$ min) est observée et de nouveaux pics apparaissent sur le chromatogramme avec un temps de rétention plus court $t_R = 4,17$ (M2a) ; 9,0 min (M1) pour l'expérience **A** en présence de *Rhodococcus rhodochrous*, et $t_R = 4,25$ (P2) ; 9,0 (P1) et 9,2 min (P3) pour l'expérience **B** en présence de FeNTA et sous irradiation. Il s'agit donc de composés plus polaires qu'ABT. Nous avons constaté que le métabolite M1 ($t_R = 9,0$ min), qui a été identifié par Nicolas Haroune dans sa thèse (2003) comme étant le 6OH-ABT, se forme aussi par la voie photochimique **B** (P1; $t_R = 9,0$ min).



Les autres composés formés, le **Métabolite 2a (M2a)** et le **Photoproduit 2 (P2)** bien qu'ils aient un temps de rétention équivalent, sont différents si l'on considère leurs spectres UV-visible (*Figure V.4 A et B*).

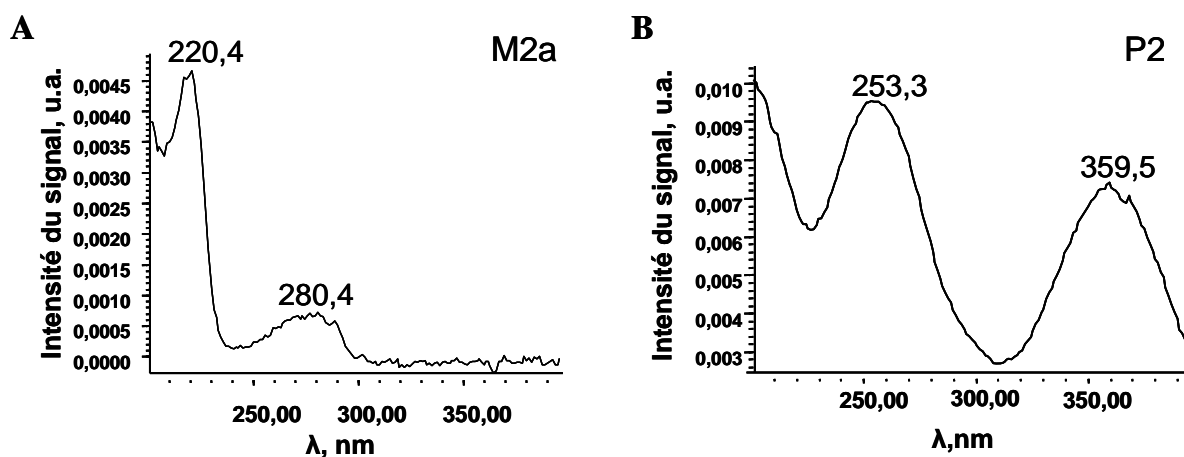


Figure V.4 : Spectres UV-visible A) du métabolite M2a et B) du photoproduit P2.

Remarque : Les spectres UV-visible sont enregistrés à partir d'un détecteur d'adsorption UV-visible à barrette de diodes.

On observe que les deux composés ont des maxima d'adsorption caractéristiques montrant la présence de double liaisons et plus généralement, la conservation du noyau aromatique. Le produit **M2a** n'est pas présent dans le témoin cellulaire, c'est donc bien un

produit de biodégradation d'ABT. Dans les conditions de photodégradation d'ABT en présence de FeNTA, un troisième **Photoproduit 3 (P3)** ($t_R = 9,2$ min) est détecté. Ces produits n'ont pas été décrits auparavant dans la littérature.

Les cinétiques d'évolution d'ABT dans ces conditions expérimentales sont présentées dans la **Figure V.5**.

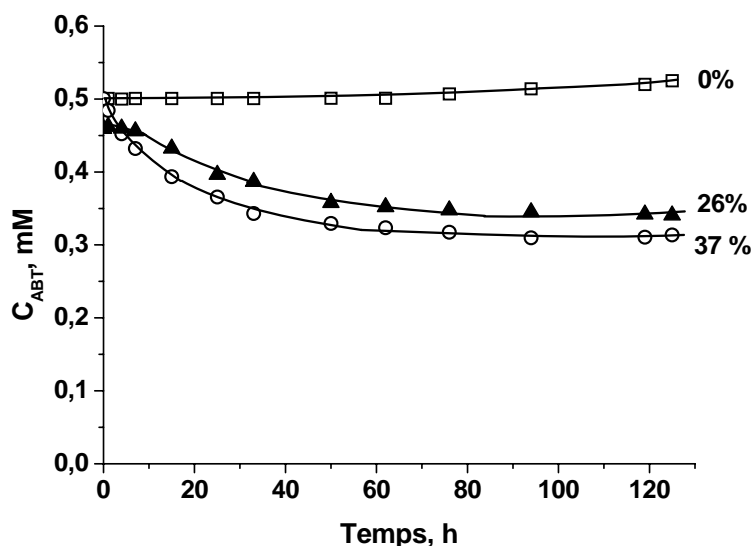


Figure V.5 : Cinétiques de dégradation d'ABT : (□) photolyse directe (365 nm) ; (○) photoinduite par FeNTA (365 nm) ; (▲) par *Rhodococcus rhodochrous* (OBT18).

Photolyse directe

Par photolyse directe à pH = 7,0 aucune transformation d'ABT (0,5 mM) n'a été observée après plus de 125 h d'irradiation. Ainsi, l'ABT est très stable dans ces conditions d'expérience. La faible augmentation d'ABT, environ 5%, est expliquée par une évaporation d'eau pendant l'expérience.

Photodégradation induite par le nitrilotriacétate de Fe(III) (FeNTA)

Le complexe FeNTA sans irradiation en solution aqueuse n'a aucun effet sur ABT. Par contre, en présence de FeNTA et de lumière à pH = 7,0, 37% d'ABT est dégradé au bout de 125 h. Ce résultat met en évidence les propriétés photoinductrices des complexes de fer. La même expérience, effectuée à pH = 4,0, conduit à une dégradation similaire. Les propriétés photoinductrices de FeNTA ont été étudiées en détail pour la dégradation du 4-chlorophénol (Abida, 2005). En revanche, la formation du photoproduit principal (6OH-ABT) est plus importante à pH = 4,0 qu'à pH = 7,0 (**Figure V.6**) :

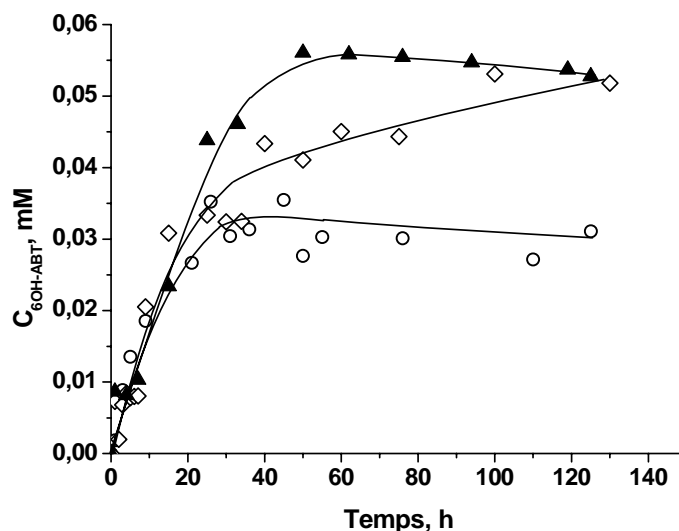


Figure V.6 : Evolution de la concentration en 6OH-ABT formé photochimiquement en présence de FeNTA à pH=4,0 (◇) ou pH=7,0 (○) et par biodégradation en présence de *Rhodococcus rhodochrous* (▲). [ABT] = 0,5mM, [FeNTA] = 1,0 mM.

Le 6OH-ABT obtenu à partir de 0,5 mM d'ABT s'accumule et représente après 125 h d'irradiation, 11% du produit de départ à pH = 4,0 et 6% à pH = 7,0. Le 6OH-ABT formé se transforme ensuite en d'autres produits d'oxydation jusqu'à minéralisation. L'ABT se transforme en parallèle par plusieurs voies de dégradation. La quantité de photoproduits formés est dépendante du pH, et est plus importante à pH acide (contrairement à la disparition d'ABT). Cette observation peut être attribuée à un phénomène de précipitation par le fer qui peut entraîner par flocculation des composés organiques, phénomène qui est très marqué à pH neutre, alors qu'à pH acide (4,0) ce phénomène de précipitation est inexistant.

Biodégradation

La biodégradation d'ABT par la souche *Rhodococcus rhodochrous* OBT18 avait été étudiée par N. Haroune au cours de sa thèse (2003).

Nos résultats confirment la faible biodégradabilité d'ABT (26% après 125 h) et la formation du métabolite **M1**, le 6OH-ABT. L'évolution de ce métabolite est présentée dans la **Figure V.6**. Par contre nous avons montré la présence d'un deuxième métabolite **M2a** qui n'avait pas été décrit jusqu'à présent.

V.1.3 Photo- et biodégradation d'ABT : étude des processus combinés

Cette partie du travail correspond à l'étude de la dégradation d'ABT par *Rhodococcus rhodochrous* OBT18 sous irradiation centrée à 365 nm ou/et en présence de nitrilotriacétate de Fe(III) à pH = 7,0:

- ABT 0,5 mM + bactéries + lumière
- ABT 0,5 mM + bactéries + FeNTA 1,0 mM
- ABT 0,5 mM + bactéries + FeNTA 1,0 mM + lumière

V.1.3.1 Cinétiques d'évolution d'ABT dans les différentes conditions expérimentales.

La biodégradation d'ABT (0,5 mM) par la souche *Rhodococcus rhodochrous* OBT18 en conditions combinées a été suivie par analyse HPLC phase inverse et RMN ^1H *in situ* des surnageants d'incubation, obtenus après centrifugation. Les chromatogrammes HPLC enregistrés aux temps 0 h, 5h, 25 h, 75h et 125 h sont présentés sur la **Figure V.7**.

On observe que l'aire d'ABT ($t_R = 10,0$ min) dans le système bactéries avec lumière (**A**) diminue beaucoup plus lentement par rapport au système d'incubation contenant du FeNTA ; dans les systèmes (**B**) et (**C**) après 25 h, il ne reste que des traces d'ABT. Au cours du temps, de nouveaux pics apparaissent avec un temps de rétention plus court $t_R = 4,17$ (M2a) ; 9,0 min (M1) pour (**A**), et $t_R = 4,25$ (M2); 9,0 (M1) et 9,2 min (M3) pour (**B**) et (**C**), ce qui correspond à des composés plus polaires que l'ABT. Un de ces métabolites est le 6OH-ABT (M1, $t_R = 9,0$ min) commun à tous les systèmes où ABT a subi une dégradation. Les autres **Métabolites 2a** et **2** (M2a, $t_R = 4,17$ min ; M2, $t_R = 4,25$ min) et le **Métabolite 3** (M3, $t_R = 9,2$ min) ont déjà été observés dans les expériences de dégradation d'ABT par les cellules seules ou par le FeNTA en présence de lumière. Ainsi, les **Métabolites 2** et **3** (M2, M3) correspondent aux **Photoproduits 2** et **3** (P2, P3) respectivement. Les similitudes de structure ont été confirmées par la comparaison de leurs spectres UV-visible.

La concentration en FeNTA ($t_R = 2,5$ min) (**Figure V.7**) évolue également au cours du temps. Elle diminue plus rapidement lorsque la lumière est combinée au système FeNTA+bactéries (système **C**) que dans les conditions sans lumière (système **B**).

On observe d'autres signaux dont l'aire augmente pendant l'incubation (notés par des étoiles sur les chromatogrammes avec un temps de rétention d'environ deux minutes).

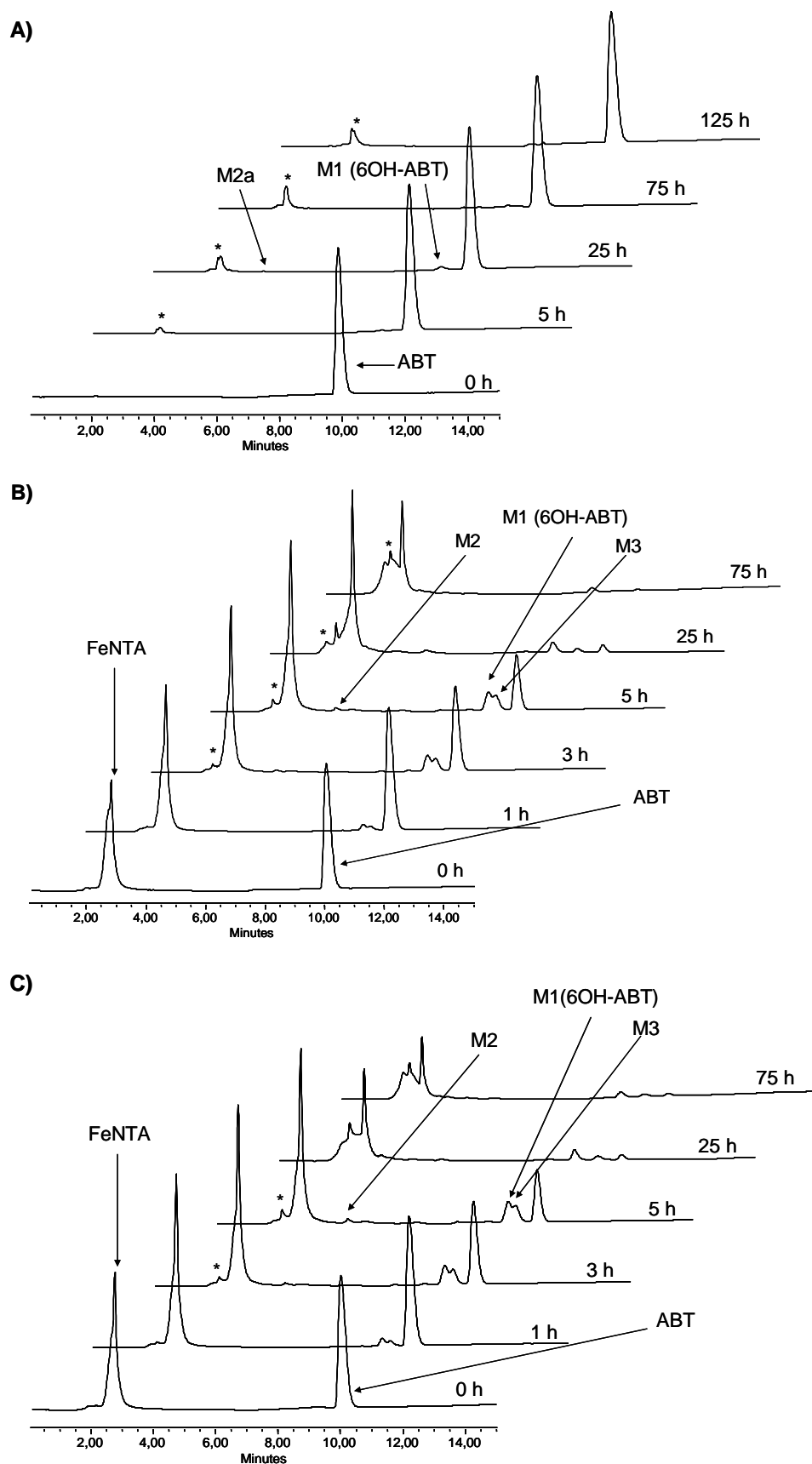


Figure V.7 : Suivi HPLC de la dégradation d'ABT par *Rhodococcus rhodochrous* : A) en présence de lumière; B) en présence de FeNTA; C) en présence de FeNTA et lumière. pH = 7,0. [ABT] = 0,5 mM, [FeNTA] = 1,0 mM. * - métabolites excrétés par les cellules.

Ils correspondent à des métabolites excrétés par les cellules, comme nous le montre l'analyse HPLC de témoins cellulaires (résultats non présentés). L'analyse par RMN *in situ* montre que ce sont des molécules organiques, qui peuvent être des acides, des acides aminés, des sucres etc. (**Figure V.8**).

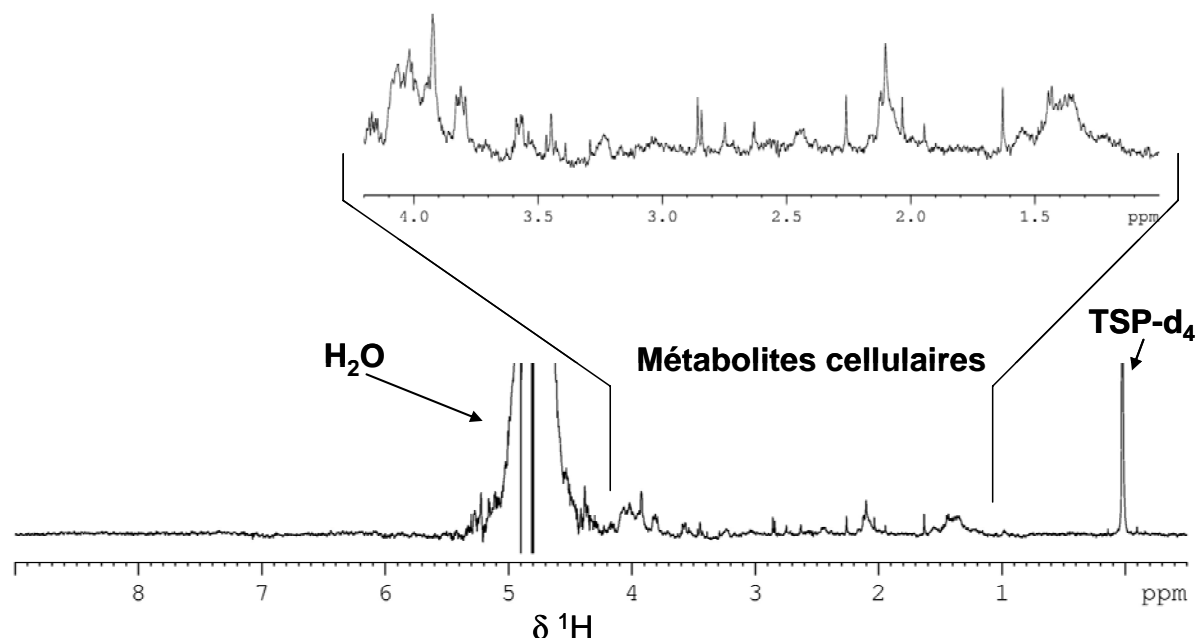


Figure V.8 : Spectre RMN ^1H *in situ* après 125 h d'incubation de témoins cellulaires de *Rhodococcus rhodochrous* en présence de lumière.

L'analyse du carbone organique total (TOC) de ce témoin permet d'étayer cette hypothèse (**Figure V.9**) :

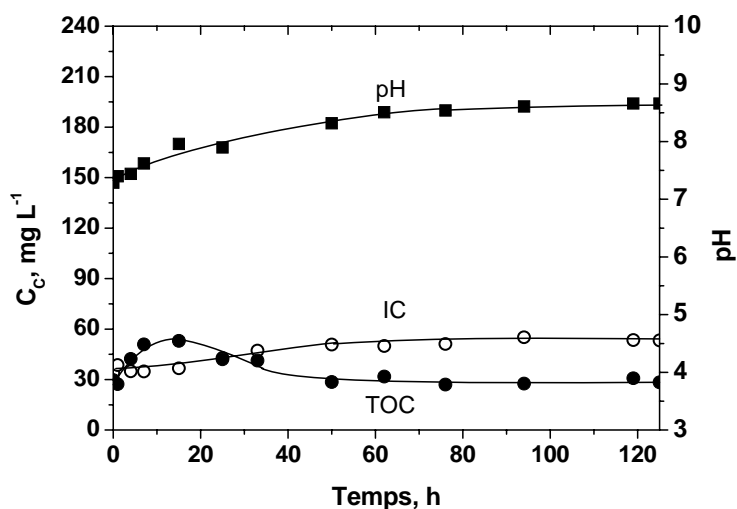


Figure V.9 : Evolution du carbone organique total (TOC) (●); carbone inorganique (IC) (○) et du pH (■) dans le surnageant témoin cellulaire pendant l'incubation.

L'analyse du TOC dénote une augmentation pendant environ 20 heures, puis une diminution des valeurs du carbone, qui restent stables par la suite. En même temps, l'augmentation du carbone inorganique (IC) pourrait être provoquée par la décarboxylation des aminoacides dans ces échantillons, avec la formation d'amines libres, qui expliquerait l'augmentation des valeurs du pH jusqu'à 8,5 (*Figure V.9*).

Les cinétiques de dégradation d'ABT dans ces systèmes combinés, établies par HPLC, sont présentées dans la *Figure V.10*.

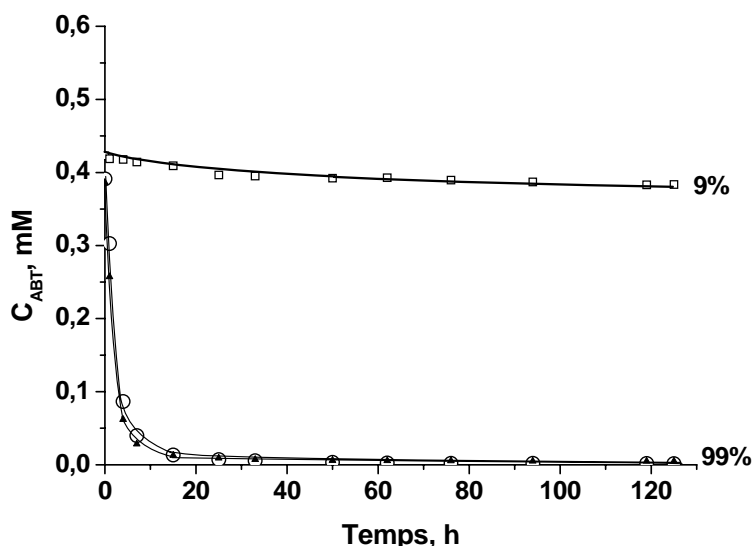


Figure V.10 : Cinétique de biodégradation d'ABT par *Rhodococcus rhodochrous* (OBT18) en présence de lumière (\square); FeNTA et lumière (\circ) ; FeNTA en absence de lumière (\blacktriangle). pH = 7,0. [ABT] = 0,5 mM, [FeNTA] = 1,0 mM.

L'analyse des résultats met en évidence le fait que la concentration d'ABT (au temps zéro) dans toutes nos expériences avec les bactéries est un peu plus faible que la concentration initiale prévue de 0,5 mM (*Figure V.10*). Dans le cas des cellules seules avec lumière, cette diminution représente 0,08 mM. Ceci peut être attribué à deux phénomènes: i) l'ajout du culot bactérien humide induit une dilution de l'ordre de 2% (soit de l'ordre de 0,01 mM) ii) ABT peut s'adsorber à la surface des cellules. Cette observation est encore plus marquée (20% de perte d'ABT de départ) en présence de complexes de fer (*Figure V.10*). Cette perte importante d'ABT peut être également attribuée à une action très rapide des bactéries en présence de fer, ce qui rend difficile l'obtention d'un vrai temps zéro T0 (*Tableau V.2*).

Conditions d'expérience	$V_{\text{initiale}}, \text{mM s}^{-1}$	% de dégradation, pratique/théorique
Bactéries + lumière	$3,5 \times 10^{-7}$	9/20
Bactéries + FeNTA	$3,6 \times 10^{-5}$	80/99
Bactéries + FeNTA + lumière	$2,4 \times 10^{-5}$	80/99

Tableau V.2 : Vitesses initiales et pourcentages de dégradation d'ABT dans les conditions combinées. $\text{pH} = 7,0$; irradiation centrée à 365 nm; $[\text{ABT}] = 0,5 \text{ mM}$, $[\text{FeNTA}] = 1,0 \text{ mM}$.

Remarque : Le pourcentage de dégradation observé est calculé avec les valeurs de concentration initiale et finale mesurées par HPLC, le pourcentage théorique est calculé en considérant la concentration initiale de 0,5 mM.

On remarque que le complexe de fer stimule les bactéries avec ou sans lumière pour la biodégradation d'ABT, la vitesse initiale de dégradation étant 100 fois plus élevée qu'en absence de FeNTA. La présence de ce complexe induit également la formation de nouveaux métabolites M2 et M3 (voir **Figure V.7**).

Comme nous l'avons montré dans le chapitre précédent, le complexe FeNTA seul en solution aqueuse n'a aucun effet sur l'ABT présent dans la même solution (**Figure V.11a**). Les bactéries seules dégradent 26% d'ABT au bout de 125 h d'incubation. Par contre, en présence de lumière, la dégradation d'ABT est ralentie puisque seulement 9% d'ABT est dégradé (**Figure V.11b**). Dans ce cas particulier, la lumière a un effet légèrement négatif sur la biodégradation d'ABT. Dans les systèmes couplant FeNTA et bactéries, la dégradation d'ABT est très rapide (dégradation totale en 30 h) que l'on soit en présence ou en absence de lumière. On peut remarquer que la combinaison des systèmes (FeNTA+bactéries avec ou sans lumière) conduit à une dégradation totale d'ABT ce qui est bien supérieur à l'addition des effets de chaque système simple : par exemple, les systèmes FeNTA sans lumière (0%) et bactérie (26%) conduiraient à seulement 26% de dégradation d'ABT, ou encore les systèmes FeNTA+lumière (37%) et bactéries+lumière (9%) conduiraient à 46% de dégradation d'ABT.

En conclusion, la combinaison des systèmes induit un effet de synergie très important.

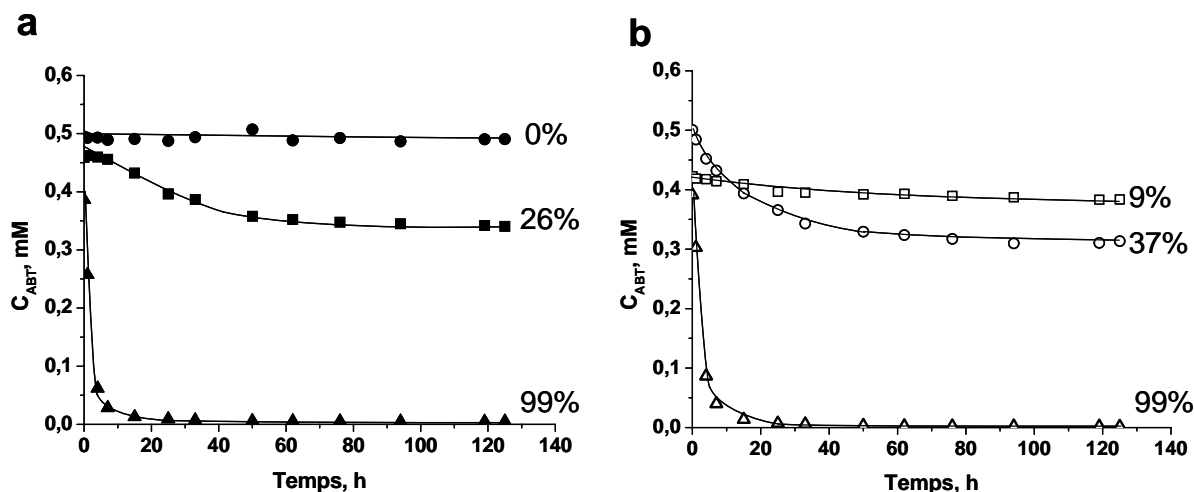


Figure V.11 : Cinétique de dégradation d'ABT a) sans lumière; b) avec lumière, par les bactéries (■, □); le FeNTA (●, ○); les bactéries et le FeNTA (▲, △). pH = 7,0; $\lambda_{max} = 365$ nm; [ABT] = 0,5 mM, [FeNTA] = 1,0 mM.

Dans ces systèmes combinés, le produit de dégradation majoritaire d'ABT est le 6OH-ABT qui a été suivi en cours d'incubation (Figure V.12).

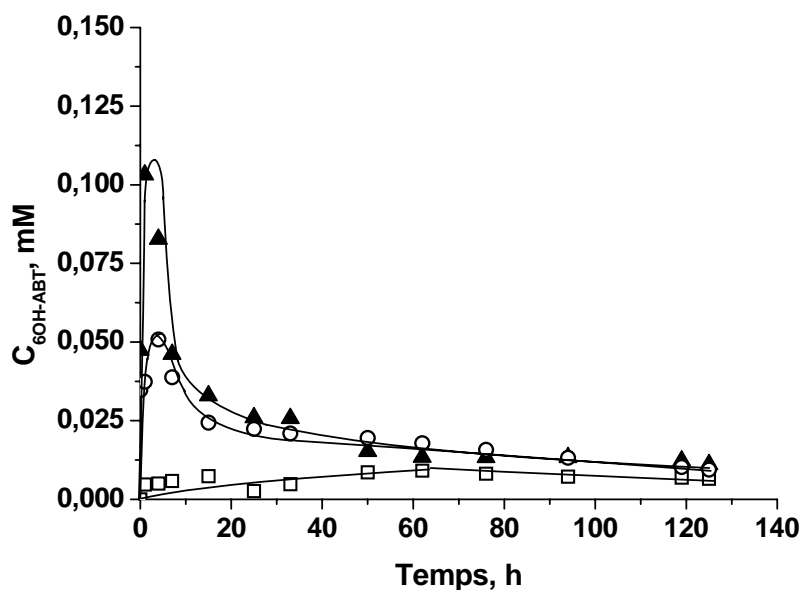


Figure V.12 : Cinétiques d'évolution du métabolite principal 6OH-ABT dans les systèmes combinés de dégradation d'ABT par *Rhodococcus rhodochrous* (OBT18) en présence de lumière (□); FeNTA et lumière (○); FeNTA (▲). pH = 7,0. [ABT] = 0,5 mM, [FeNTA] = 1,0 mM.

Remarque : La concentration en 6OH-ABT a été calculée après préparation d'une solution étalon du produit synthétisé au laboratoire SEESIB.

Le 6OH-ABT se forme dans tous les systèmes combinés. Cependant, on remarque des différences importantes dans les cinétiques. Dans le système ne comportant que des cellules,

le 6OH-ABT s'accumule pour atteindre un plateau correspondant à une concentration égale à environ 0,05 mM soit 10% d'ABT dégradé (**Figure V.6**). Si l'on ajoute de la lumière, on retrouve une faible concentration constante de 6OH-ABT à environ 0,01 mM correspondant dans ce cas à 2% d'ABT dégradé. Dans les systèmes comportant du FeNTA, la cinétique de formation du 6OH-ABT passe par un maximum au bout de quelques heures d'incubation puis ce composé se dégrade pour atteindre une valeur de 0,02 mM en fin d'incubation. Le maximum de formation du 6OH-ABT atteint une concentration de 0,1 mM (correspondant à 20% de la concentration d'ABT de départ) dans le système FeNTA + bactéries alors que ce maximum n'est que de 0,05 mM dans le système complet (FeNTA + bactéries + lumière). Ce résultat suggère une intervention de la lumière dans le schéma de dégradation du 6OH-ABT.

Les évolutions des métabolites M2 et M3, établies par HPLC, sont présentées dans la **Figure V.13**.

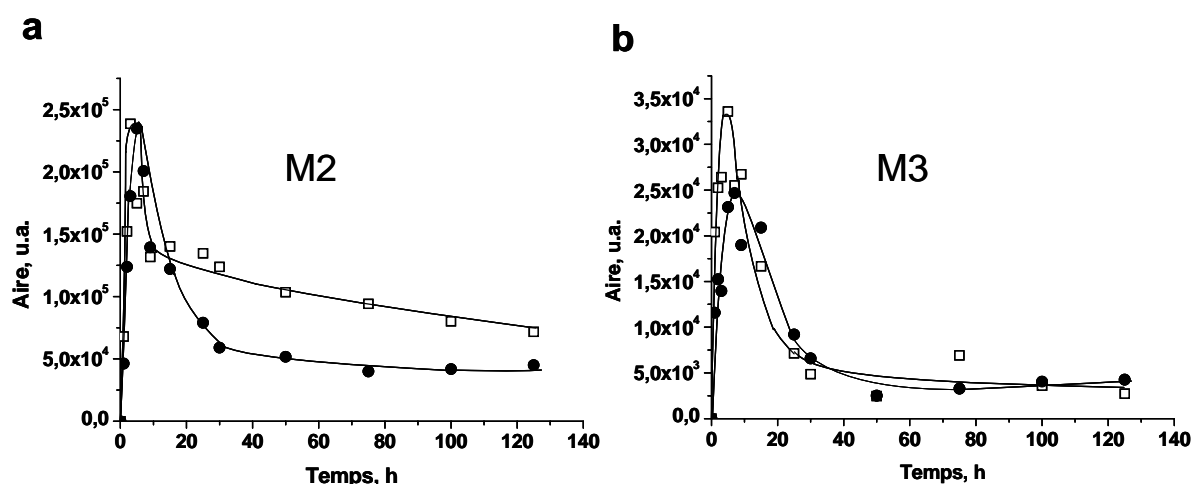


Figure V.13 : Evolution du métabolite 2 (a) et du métabolite 3 (b) dans les systèmes contenant des bactéries et FeNTA, avec lumière (\square) et sans lumière (\bullet).

On observe que les deux métabolites s'accumulent de la même manière au début de la dégradation d'ABT jusqu'à un maximum pour 4 h d'expérience, puis ils se dégradent à leur tour. Un faible effet de la lumière est remarqué par rapport à l'évolution du métabolite M3, qui s'accumule plus en présence de lumière.

V.1.3.2 Influence de la concentration en FeNTA sur les processus de biodégradation d'ABT

Le but de cette expérience était à la fois de réduire la concentration en complexe de fer pour envisager des applications environnementales mais également de regarder l'influence de cette concentration sur l'effet de l'activation de la biodégradation.

La **Figure V.14** représente l'évolution des concentrations en ABT lors de la biodégradation par *Rhodococcus rhodochrous* en présence de concentrations croissantes de FeNTA de 0 à 1 mM et en absence de lumière.

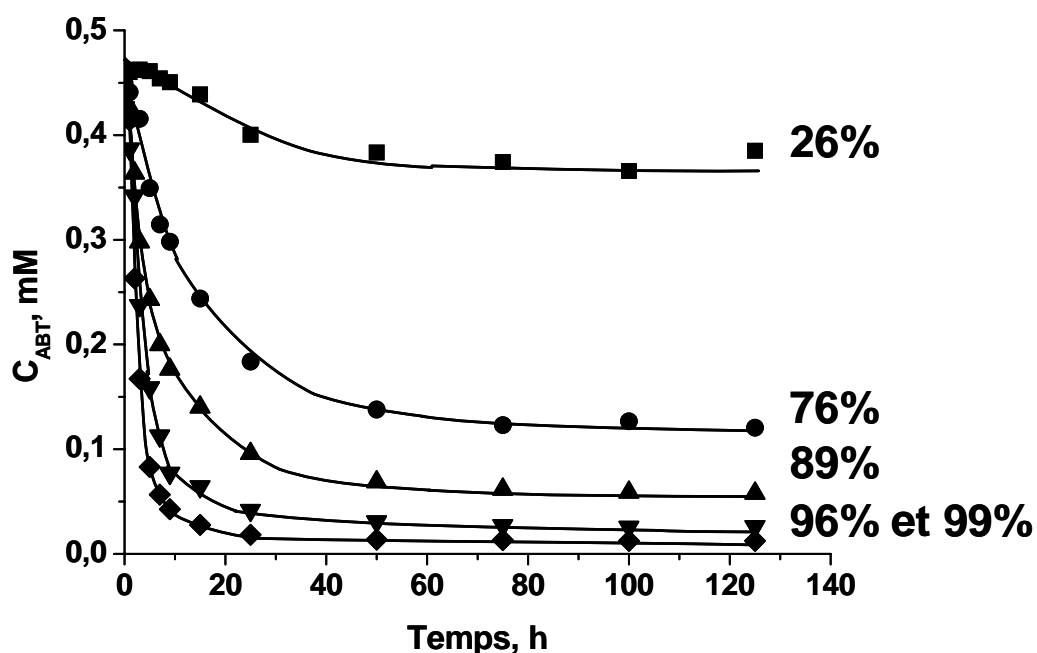


Figure V.14 : Cinétiques de dégradation d'ABT (0,5 mM) par *Rhodococcus rhodochrous* en présence de concentrations variables de FeNTA (■ 0, ● 0,1, ▲ 0,25, ▼ 0,5 et ◆ 1,0 mM) en absence de lumière.

Ces résultats montrent clairement l'effet positif de la concentration du complexe de fer FeNTA sur la biodégradation de ABT. Cependant il faut remarquer que cet effet n'est pas linéaire comme le montre la **Figure V.15a** qui représente le pourcentage de dégradation d'ABT obtenu après 125 h d'incubation.

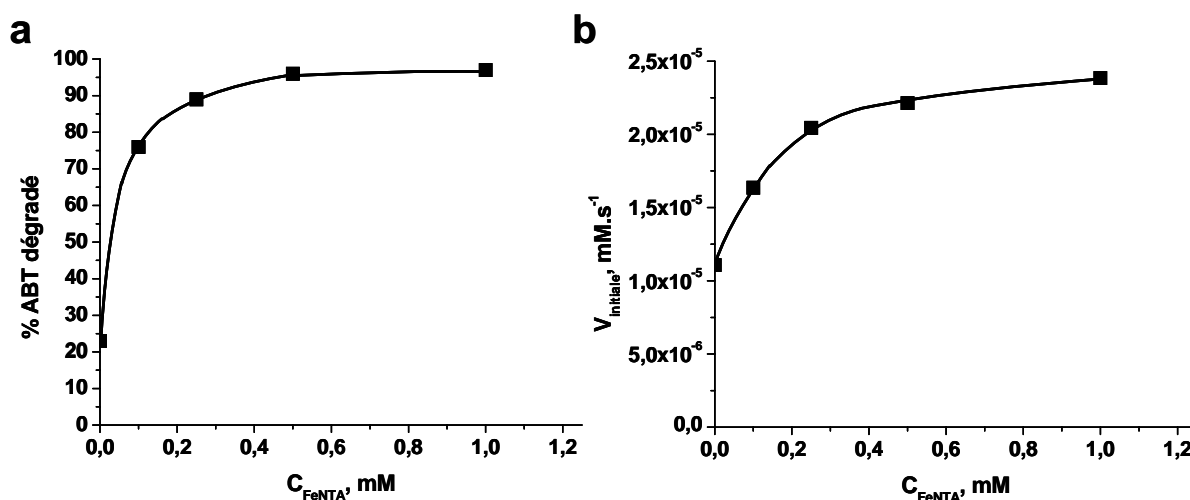


Figure V.15 : Pourcentage (a) et vitesse initiale (b) de dégradation d'ABT (0,5 mM) après 50 h d'incubation avec la souche *Rhodococcus rhodochrous* en fonction de la concentration en FeNTA (0 à 1,0 mM).

Ces résultats montrent tout d'abord que nous obtenons le même pourcentage de dégradation d'ABT à 1,0 et 0,5 mM en FeNTA. Un excès de fer supplémentaire n'a pas d'impact pour l'efficacité de la transformation d'ABT. De plus, il faut également remarquer que l'addition de 0,1 mM de FeNTA permet de multiplier d'un facteur supérieur à 3 l'efficacité de transformation d'ABT. Sur la **Figure V.15b**, nous remarquons que la présence de complexe de fer a également un rôle positif sur la vitesse initiale de dégradation d'ABT. Cette accélération est également moins marquée quand la concentration en complexe de fer passe de 0,5 à 1,0 mM.

Cependant si l'on regarde l'évolution du métabolite principal 6OH-ABT présentée dans la **Figure V.16**, la quantité de complexe de fer a un impact beaucoup plus important. Alors qu'aucune différence n'a été notée pour la transformation d'ABT pour des concentrations en FeNTA égale à 1,0 et 0,5 mM, la transformation du 6OH-ABT est moins efficace à 0,5 mM. En effet après 50 h d'incubation, il reste 0,02 mM de 6OH-ABT avec une concentration en FeNTA égale à 1,0 mM alors qu'elle est égale au double 0,04 mM pour une concentration en FeNTA de 0,5 mM.

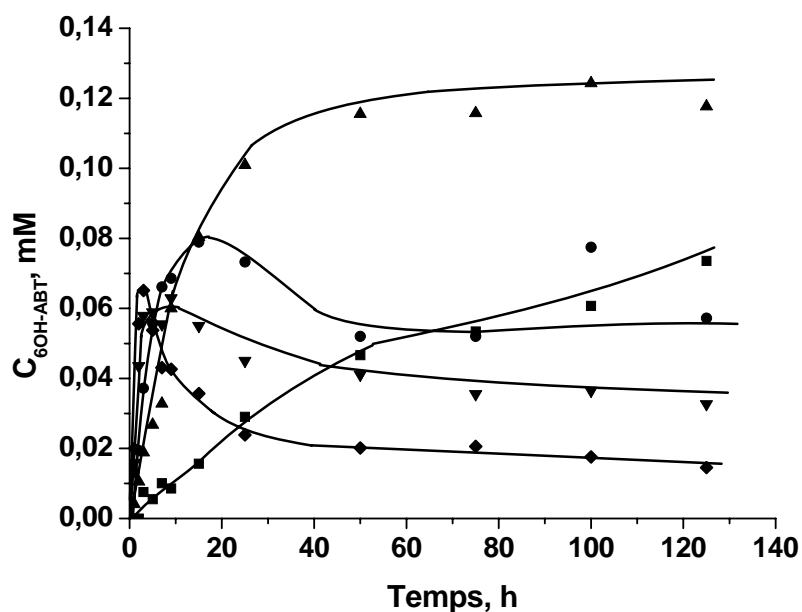


Figure V.16 : Evolution de la concentration du 6OH-ABT au cours de la transformation d'ABT (0,5 mM) en présence de *Rhodococcus rhodochrous* en fonction de la concentration en FeNTA (■ 0, ▲ 0,1, ● 0,25, ▼ 0,5 et ◆ 1,0 mM).

On observe que l'évolution du 6OH-ABT en présence de FeNTA 0,1 mM est plus singulière par rapport aux autres systèmes. En effet, dans ce cas, à la fin de la cinétique, on observe une accumulation du 6OH-ABT égale à 0,12 mM. La forme de la cinétique est très similaire à celle obtenue quand ABT est dégradé uniquement en présence de bactéries. Ce résultat laisse à penser que la quantité de fer, pour une concentration égale à 0,1 mM, n'est pas suffisante pour continuer d'accélérer le processus de dégradation sur le 6OH-ABT qui est le premier intermédiaire majoritaire de la dégradation d'ABT.

V.1.4 Identification des photoproduits et métabolites

Cette partie du travail est présentée à partir d'une expérience combinant uniquement le complexe de fer et les microorganismes. En effet, dans ces conditions, nous observons le maximum de métabolites et en concentrations les plus élevées. Le chromatogramme après 12,5 h d'incubation est présenté dans la **Figure V.17**.

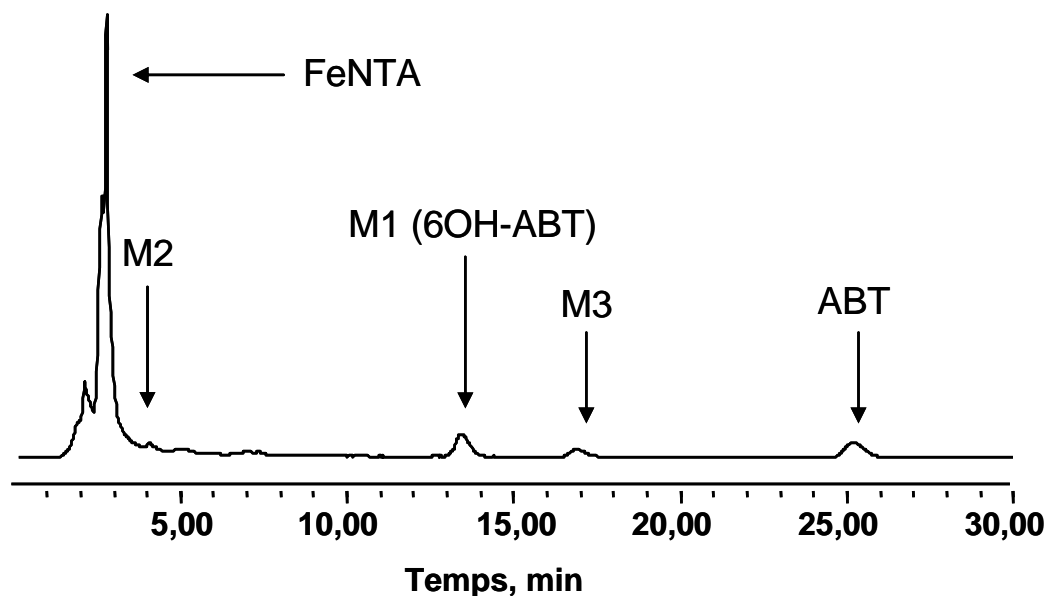


Figure V.17 : Chromatogramme enregistré après 12,5 h d'incubation (Conditions isocratiques, $[ABT] = 0,5 \text{ mM}$, $[FeNTA] = 1,0 \text{ mM}$, $pH = 7,0$, $T = 30 \text{ }^{\circ}\text{C}$).

Trois métabolites principaux d'ABT (absents dans le témoin cellulaire) sont observés avec des temps de rétention de 16,9 min (métabolite 3), 13,4 min (métabolite 1) et 4,1 min (métabolite 2). Le métabolite 1 élué à 13,4 minutes a été identifié précédemment comme étant le 6-OHABT. Les spectres UV-visible des trois métabolites (**Figure V.18**) sont en accord avec une structure aromatique.

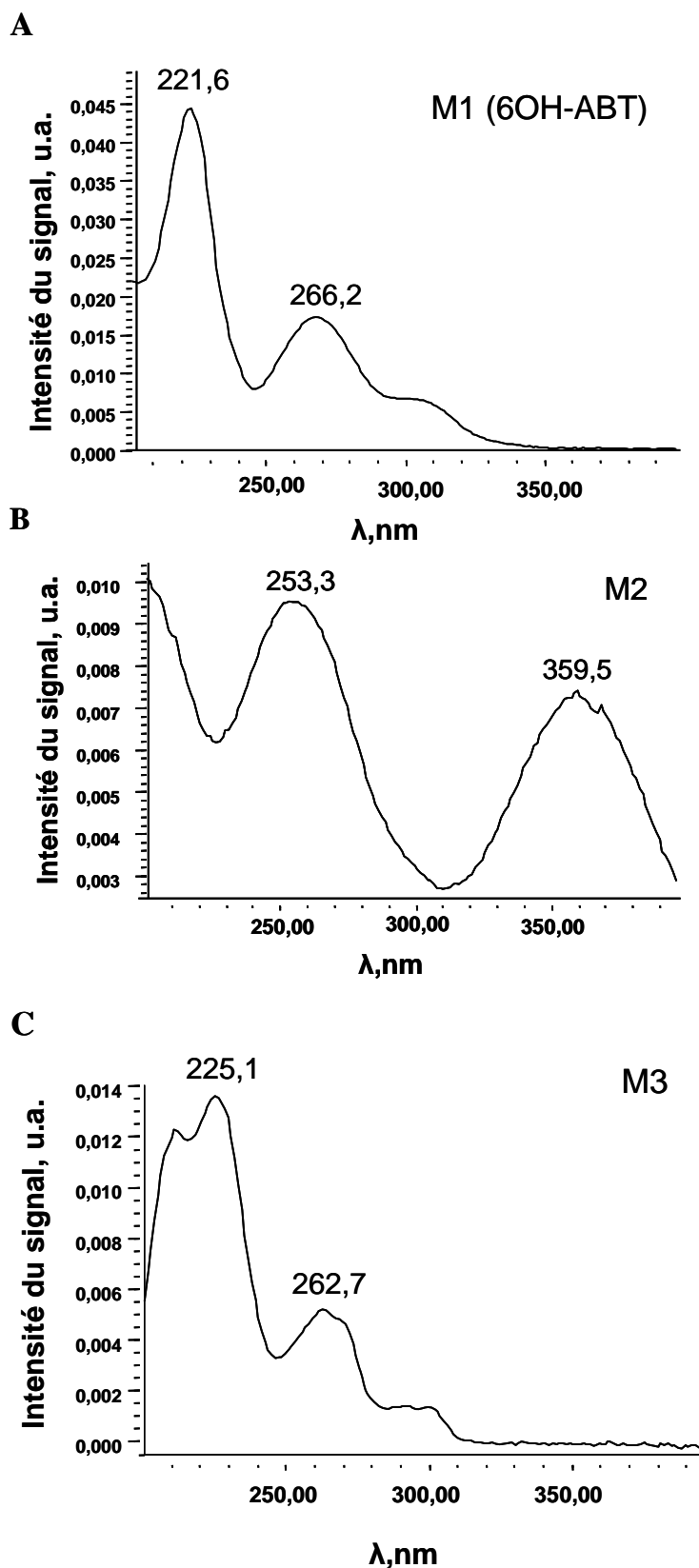


Figure V.18 : Spectres UV-visible des trois métabolites principaux de ABT : A) M1 (6OH-ABT); B) M2 et C) M3.

Une expérience spécifique a été mise en place pour obtenir des quantités plus importantes de chacun des métabolites afin de les identifier. Quatre erlenmeyers ont été

incubés simultanément et l'un d'entre eux nous a servi de contrôle pour savoir à quel stade il fallait arrêter la dégradation pour obtenir une quantité maximale de métabolites M2 et M3. Cette évolution suivie par HPLC est présentée sur la **Figure V.19**.

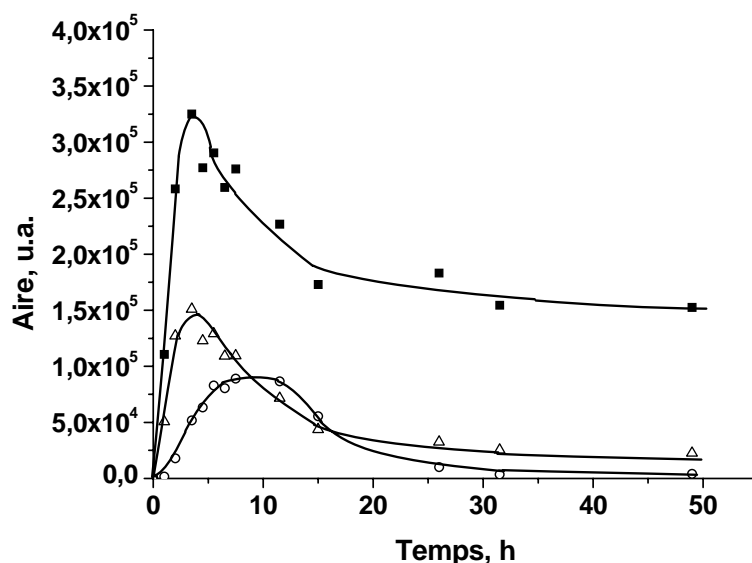


Figure V.19 : Evolution des concentrations des trois métabolites de ABT en fonction du temps d'incubation. (■) – M1 (6OH-ABT) ; (○) – M2 ; (△) – M3.

Afin d'obtenir le meilleur compromis pour les métabolites 2 et 3, nous avons stoppé les incubations après 12,5 h, temps pour lequel 90 % d'ABT sont dégradés.

Pour concentrer les métabolites, le surnageant de 2 erlenmeyers (200 mL) a été lyophilisé et repris dans D₂O pour une analyse par RMN du proton (**Figure V.20**).

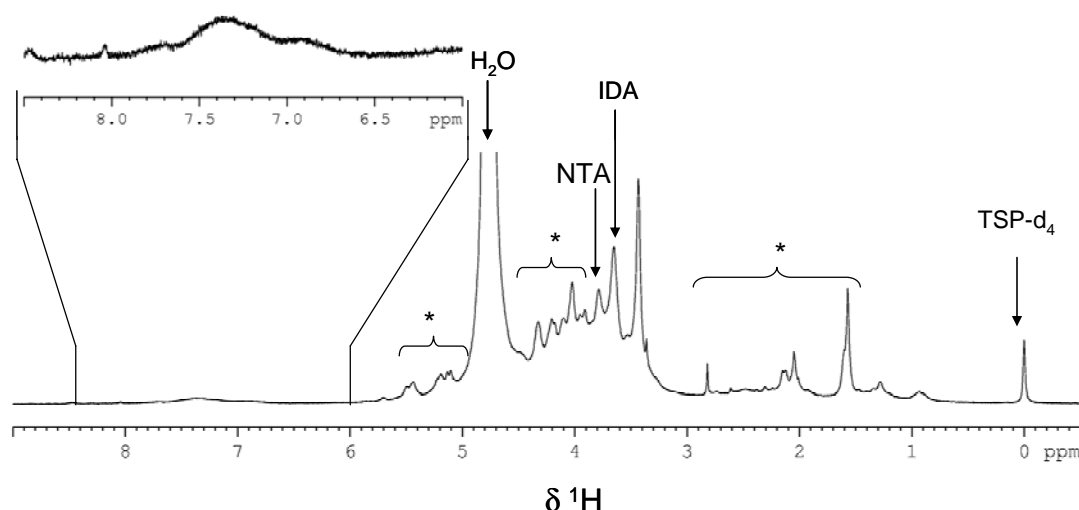


Figure V.20 : Spectre RMN du proton du lyophilisat obtenu à partir des 200 mL de surnageant. * - métabolites cellulaires.

Le spectre obtenu est difficilement interprétable : d'une part la zone entre 0 et 5 ppm contient de nombreux signaux provenant des cellules et du FeNTA et d'autre part dans la zone aromatique qui nous intéresse entre 6 et 8 ppm, les pics sont très élargis, phénomène qui est certainement dû à la présence de fer qui est un élément paramagnétique. Une autre raison de la mauvaise qualité du spectre est également la forte concentration en sels. Une autre méthode a donc été développée pour palier ce problème d'analyse.

Nous avons utilisé la méthode SPE, décrite dans la partie Matériel et Méthodes, schématisée ci-dessous (*Figure V.21*).

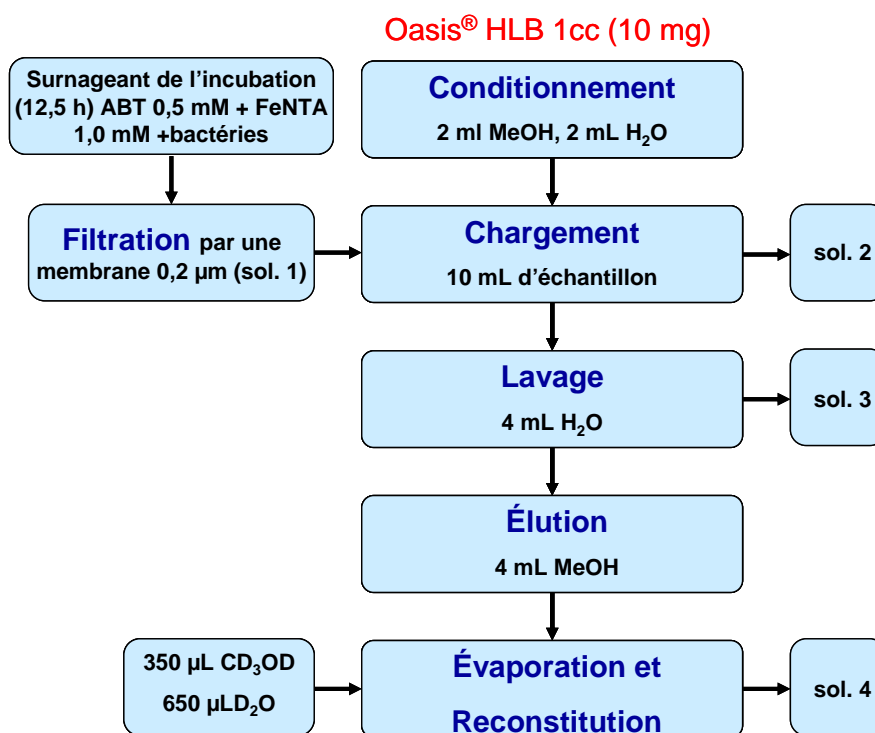


Figure V.21 : Protocole de concentration par la méthode SPE

Les chromatogrammes HPLC des solutions 1, 2, 3 et 4 obtenues après les différentes étapes du protocole SPE sont présentés dans la *Figure V.22*.

La solution 1 correspond au surnageant de l'échantillon de départ. La solution 2 correspond à la phase aqueuse récupérée après un passage sur la cartouche. Nous remarquons la présence des produits polaires, du complexe de fer et d'une partie du métabolite 2. Aucune trace d'ABT, du 6OH-ABT et du métabolite 3 n'est visible. La solution 3, qui correspond à un lavage avec de l'eau milliQ, contient un peu de 6OH-ABT et un produit très polaire non identifié. La solution 4 obtenue après élution au méthanol, montre la présence d'ABT et de ses métabolites. Cependant le métabolite 2 est en faible concentration. De plus, une grande partie des produits les plus polaires a été éliminée.

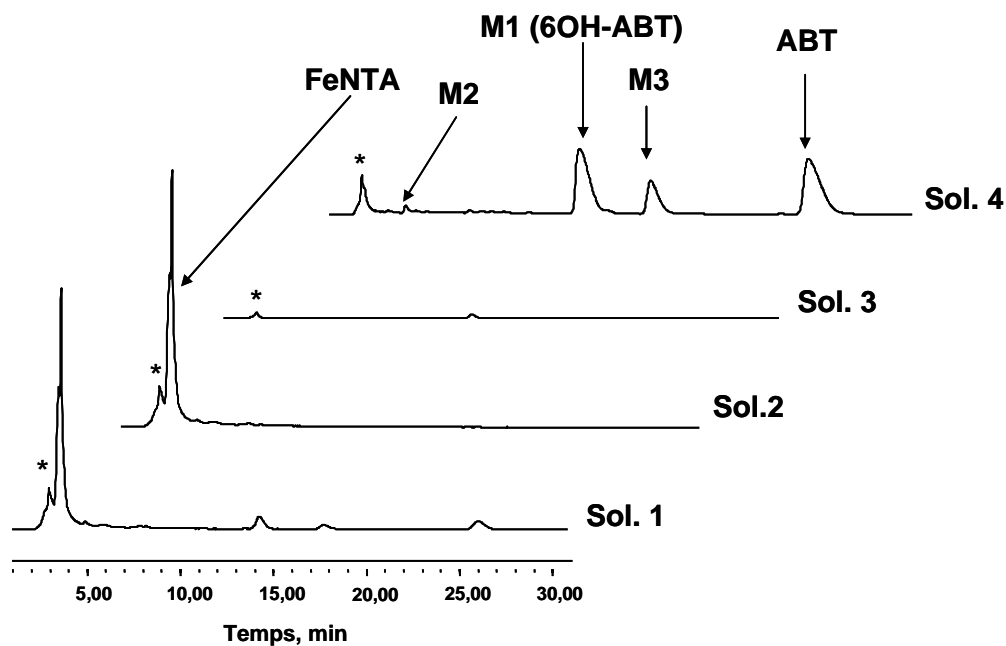


Figure V.22 : Chromatogrammes enregistrés après les différentes étapes du traitement SPE (Conditions isocratiques).

La solution 4 a été analysée par RMN du proton (**Figure V.23a** et **23b**).

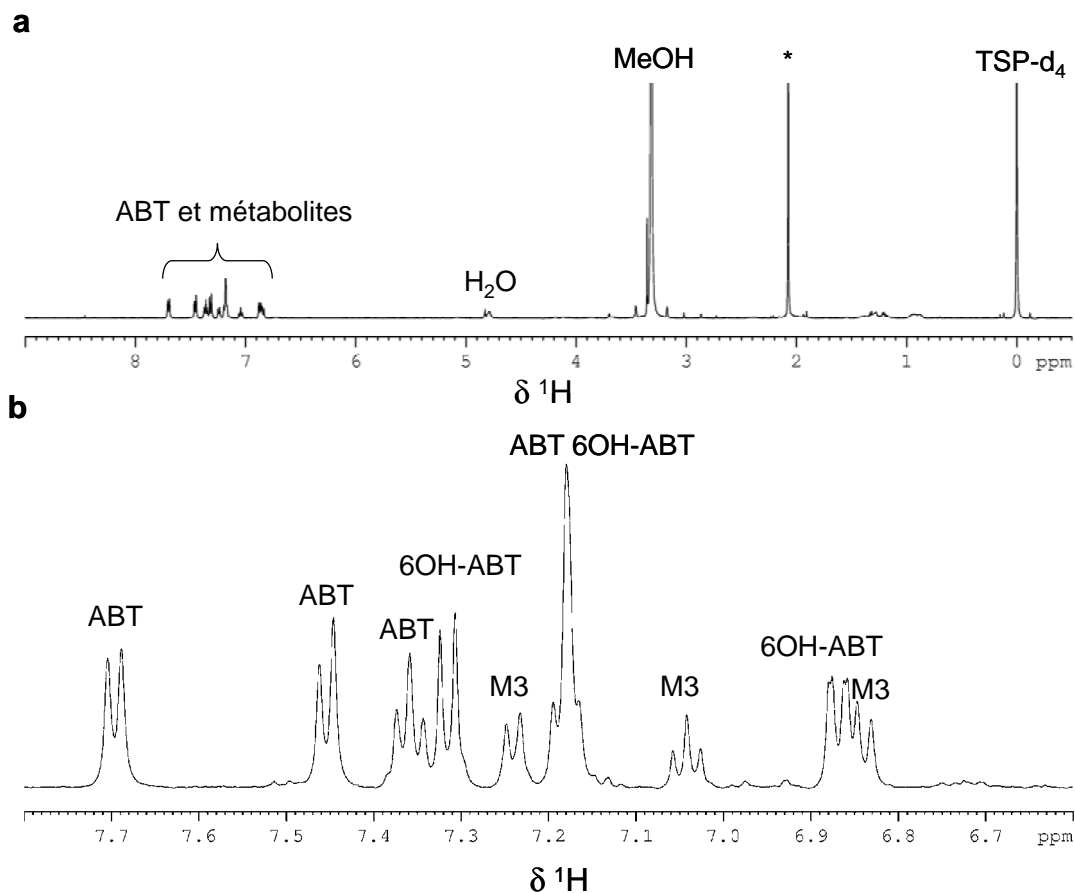


Figure V.23 : a) Spectre RMN ^1H de la solution 4 obtenue après élution au méthanol
b) agrandissement de la zone des aromatiques. * - métabolites cellulaires.

Un bilan quantitatif, obtenu après analyse HPLC, dosage du fer et analyse RMN du proton, des produits restant au cours des différentes étapes de purification par SPE est présenté dans le **Tableau V.3**.

Nr de sol	6OH-ABT	M3	ABT	Dosage du Fe _{total}
Sol. 1	0,036 mM ^a	0,011 mM ^c	0,027 mM ^a	0,662 mM
Sol. 2	0	0	0	0,627 mM
Sol. 3	0,007mM ^a	0	0	0,007 mM
Sol. 4 (concentrée 10 ×)	0,299 mM ^a	-	0,284 mM ^a	0,028 mM
	0,292 mM ^b	0,130 mM ^b	0,282 mM ^b	
Rendement	83 %	117 %	107 %	96% du fer éliminé

^a- HPLC;

^b- RMN ¹H avec standard interne TSPd₄ (0,5 mM);

^c- recalculé.

Tableau V.3 : Concentrations des différents produits restant en solution après chaque étape du traitement SPE.

Les dosages réalisés pour déterminer les concentrations en fer montrent que le traitement SPE permet d'éliminer presque totalement le fer de la solution. Le fer n'est pas retenu sur la cartouche dès la première étape du traitement et se retrouve dans la solution 2. L'absence de fer dans la solution 4 explique la bonne résolution du spectre RMN du proton de cet échantillon. Les trois produits dérivés du benzothiazole sont retrouvés quasi quantitativement dans la solution après élution par le méthanol (Solution 4). De plus, cette étape permet de concentrer l'échantillon initial d'un facteur 10. La présence plus importante du métabolite 3 obtenu après le traitement SPE a permis de calculer sa concentration à partir du spectre RMN ¹H. Nous avons donc pu remonter à la concentration de ce métabolite dans la solution initiale.

La méthode utilisée permet à la fois d'éliminer le fer et de concentrer l'échantillon, conditions très favorables pour des analyses par RMN et par spectrométrie de masse.

V.1.4.1 Identification du métabolite 2 (**M2**)

Ce métabolite n'a pas pu être identifié par RMN ou par HPLC couplée à la spectrométrie de masse. Après le traitement SPE, la concentration de ce métabolite reste encore trop faible pour pouvoir l'identifier par RMN. De plus, lors de l'analyse HPLC couplée à la spectrométrie de masse, ce produit ne semble pas stable pendant l'analyse puisque qu'il n'est plus détecté dans le spectromètre de masse.

Le spectre UV-visible du métabolite 2 et du photoproduit P2, obtenu par HPLC avec un détecteur à barrette de diodes, montre deux bandes d'absorption centrées à 253 et 360 nm (**Figure V.4B**). Ce spectre nous montre que le noyau aromatique est toujours présent (bande à 253 nm). D'autre part, la bande centrée à 396 nm peut correspondre à la formation d'un complexe entre le fer et un des produits de dégradation de l'ABT. En effet, ce métabolite n'a été identifié qu'en présence de fer. De plus, Brand (1998, *et al.*, 2000) a observé la formation d'un produit de dégradation du 4-octylphénol photoinduite par des complexes aqueux de fer présentant le même type de spectre UV-visible (bandes d'absorption à 265 et 396 nm) (**Figure V.24**).

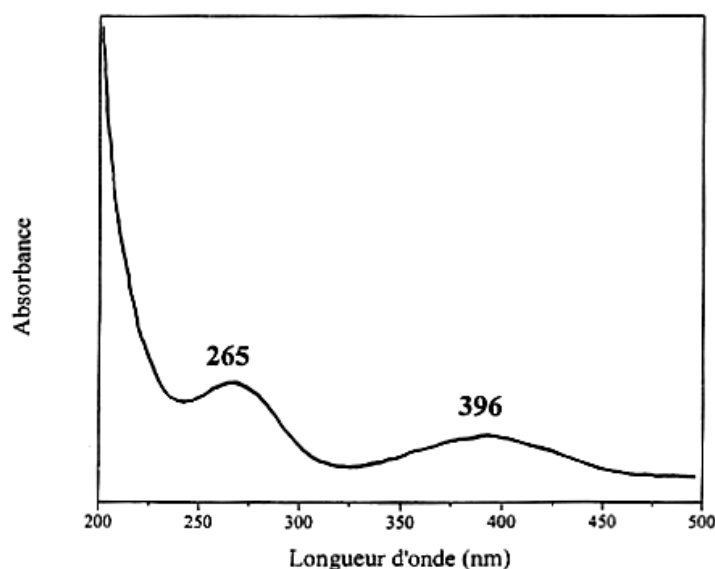


Figure V.24 : Spectre UV-visible du photoproduit attribué à un complexe fer(III)-catéchol (Brand, 1998).

Ce photoproduit a été attribué à un complexe entre le fer et le 4-octylpyrocatechol après des essais de complexation réalisés entre le fer et le catéchol. En effet, une bande dont le maximum se situe vers 400 nm apparaît après addition de fer(III) dans la solution.

D'après toutes ces observations nous pouvons faire l'hypothèse de la formation d'un complexe entre le fer(III) et un catéchol provenant de l'hydroxylation supplémentaire d'un dérivé hydroxylé d'ABT (OH-ABT) par voie photochimique ou biologique. Il faut noter également qu'en présence de *Rhodococcus rhodochrous* OBT18, deux dérivés du benzothiazole étudiés qui sont l'OBT et le MBT, sont dégradés par des enzymes *via* un dérivé dihydroxylé sur le noyau aromatique (Haroune *et al.*, 2004).

V.1.4.2 Identification du métabolite 3 (M3)

D'après le spectre RMN du proton présenté dans la **Figure V.23**, le métabolite 3 a gardé la structure «benzothiazole». Par contre, il n'a plus que trois protons aromatiques (trois massifs dans la zone aromatique entre 6 et 8). De plus, on peut dire qu'ils sont vicinaux d'après les multiplets obtenus et les constantes de couplage (deux doublets et un triplet). Le noyau aromatique du métabolite 3 est donc substitué en position 4 ou 7.

Afin de déterminer la nature du substituant, une analyse par HPLC couplée à la spectrométrie de masse a été réalisée (**Figure V.25**).

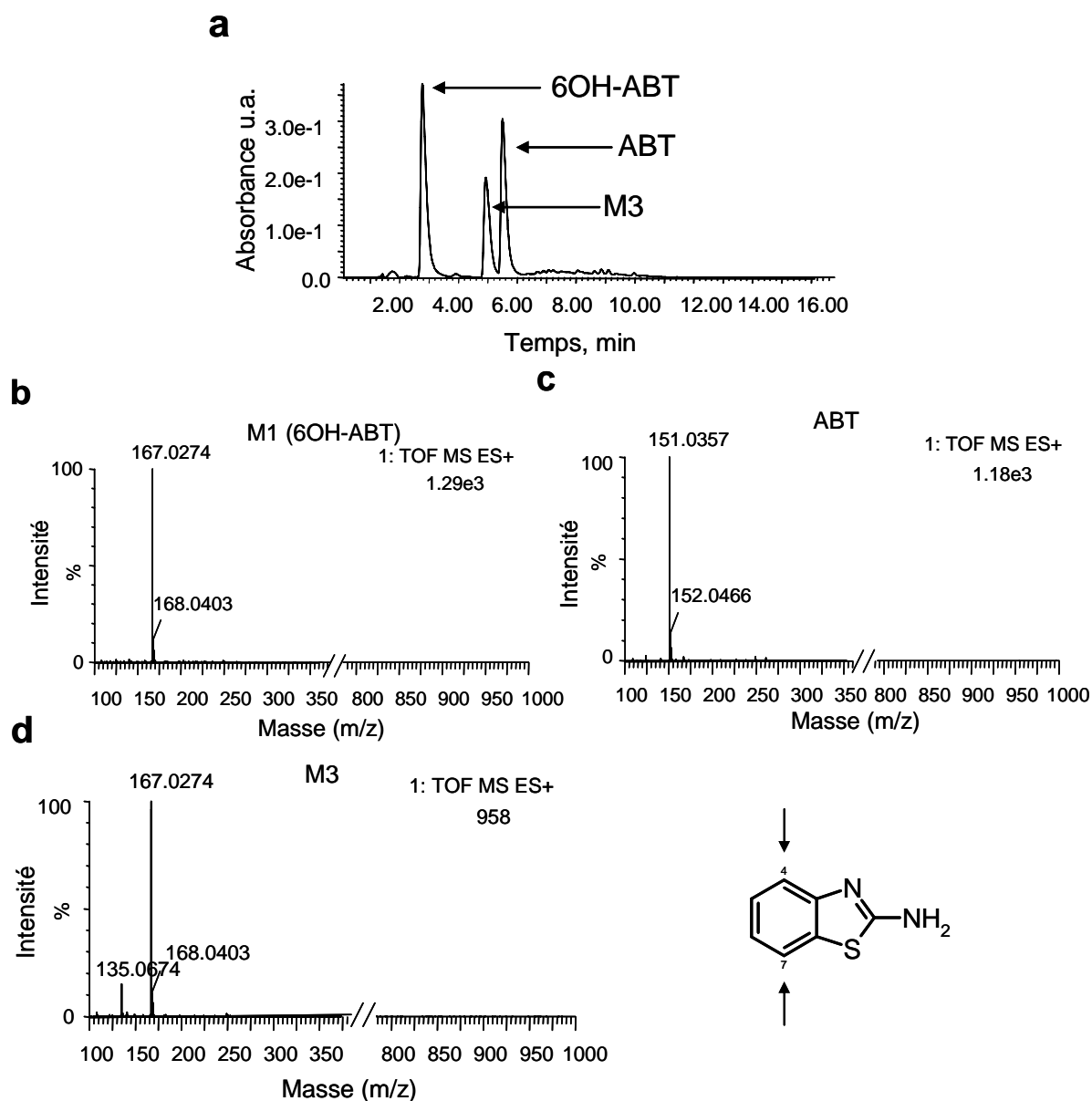


Figure V.25 : Résultats de l'analyse par HPLC couplée avec la spectrométrie de masse (ionisation par électrospray, détection en mode positif). Chromatogramme obtenu avec un détecteur d'adsorption UV-visible à barrette de diodes (a); Spectres de masse du 6OH-ABT (b); d'ABT (c) et du métabolite 3 (d).

L'attribution des trois pics obtenus après la séparation HPLC aux différents métabolites a été faite par l'intermédiaire des spectres UV-visible obtenus. Les masses obtenues correspondent à l'ABT ($[M + H]^+ = 151$), au 6OH-ABT ($[M + H]^+ = 167$) et au métabolite 3 ($[M + H]^+ = 167$). La masse obtenue pour le métabolite 3 est identique, en considérant la quatrième décimale, à celle du 6OH-ABT. Ceci nous indique que le substituant du noyau aromatique est un hydroxyle (+ 16). Cependant l'analyse par spectrométrie de masse ne nous permet pas de conclure quant à la position 4 ou 7 du substituant. Pour répondre à cette incertitude, nous avons tout d'abord entrepris la synthèse du 4OH-ABT. Le spectre RMN 1H du produit de synthèse est représenté sur la **Figure V.26**.

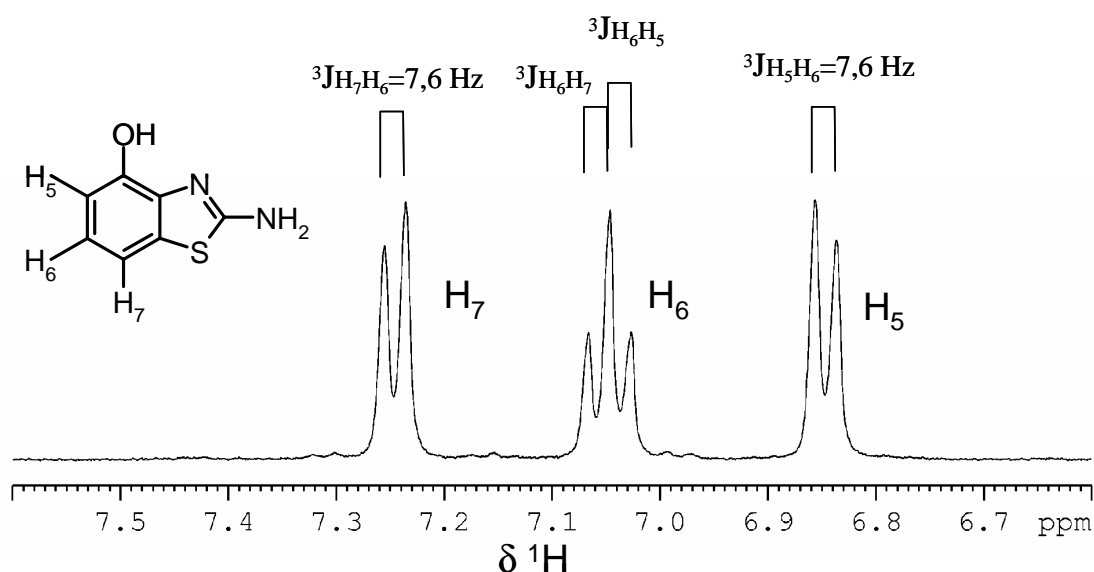
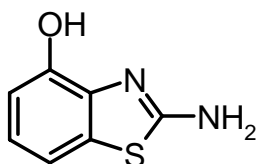


Figure V.26 : Spectre RMN 1H (zone des aromatiques) du 4OH-ABT obtenu par synthèse.

Ce spectre est identique à celui attribué au métabolite 3. Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons ajouté le produit de synthèse dans l'échantillon après traitement SPE et nous avons réalisé à la fois une injection HPLC et un spectre RMN 1H de ce mélange. Nous observons une augmentation du pic HPLC et des signaux RMN correspondants au métabolite 3. Le métabolite 3 est donc bien le 4OH-ABT.

M3:



2-amino-4-hydroxybenzothiazole

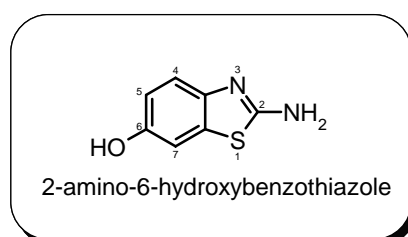
4OH-ABT

V.1.5 Photo et biodégradation du 6OH-ABT (produit de dégradation majoritaire de ABT) : systèmes simples et combinés

Pendant les études de dégradation d'ABT, nous avons montré que le 6OH-ABT est le produit majoritaire de dégradation commun aux voies biotique et abiotique des systèmes simples ou combinés. Afin de mieux comprendre les résultats observés précédemment et de progresser dans le mécanisme de dégradation de l'ABT, nous avons entrepris le même type d'étude de photo et biodégradation sur le 6OH-ABT.

V.1.5.1 Caractéristiques physico-chimiques du 6OH-ABT

La structure chimique du 2-amino-6-hydroxybenzothiazole (6OH-ABT) est présentée ci-dessous :



Le 6OH-ABT se présente sous la forme d'une poudre blanche, ses principales caractéristiques physico-chimiques sont présentées dans le **Tableau V.4** :

Formule brute	C ₇ H ₆ N ₂ OS
Masse molaire	166,20 g mol ⁻¹
Température de fusion	249-251°C
Température d'ébullition	décomposition
pKa	4,2

Tableau V.4 : Propriétés physico-chimiques du 6OH-ABT.

Le spectre d'absorption UV-visble du 6OH-ABT à pH 7,0 dans l'eau est présenté **Figure V.27** :

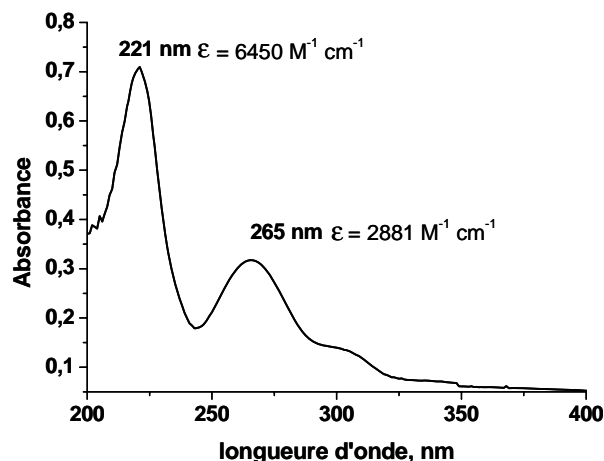


Figure V.27 : Spectre UV-visble du 6OH-ABT 0,1 mM dans l'eau, pH = 7,0.

On observe deux maxima d'absorption centrés à 221 et 265 nm avec des coefficients d'absorption moléculaire respectivement à 6450 et 2880 M⁻¹ cm⁻¹. Un épaulement situé vers 300 nm est également présent dans le spectre. Si on compare ce spectre UV-visible à celui de l'ABT, l'introduction d'un substituant OH en position 6 a une influence faible sur le déplacement batho- et hyperchromique qui déplace les maxima vers les grandes longueurs d'onde.

Les différents spectres en fonction du pH sont présentés dans la **Figure V.28a**. Le pKa du 6OH-ABT a été évalué d'après la **Figure V.28b**, sa valeur est de 4,2. Nous obtenons la même valeur que pour l'ABT.

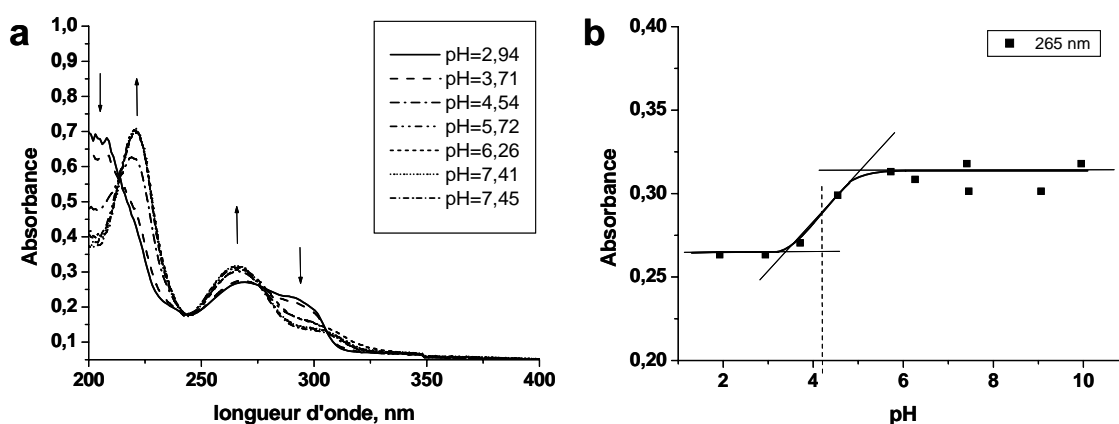


Figure V.28 : a) Spectres UV-visible du 6OH-ABT à différents pH, b) Evolution de l'absorbance en fonction du pH à 265 nm.

V.1.5.2 Photodégradation du 6OH-ABT : étude des systèmes simples

Nous avons tout d'abord évalué la dégradation photochimique du 6OH-ABT en présence ou non de complexe de fer. Nous avons travaillé à plus faible concentration (0,12 mM) que pour ABT car d'une part la concentration de 6OH-ABT dans le surnageant a toujours été inférieure ou égale à 0,12 mM quelle que soit l'expérience (**Figure V.16**) et d'autre part la solubilité de ce composé est inférieure à celle de l'ABT. Deux concentrations de complexes de fer ont été étudiées: 0,2 mM pour un rapport stoechiométrique 1:2 similaire à la dégradation d'ABT par FeNTA et 1,0 mM pour comparer les résultats avec ceux obtenus lors de la dégradation d'ABT:

- 6OH-ABT 0,12 mM + FeNTA 0,2 mM + lumière
- 6OH-ABT 0,12 mM + FeNTA 0,2 mM
- 6OH-ABT 0,12 mM + lumière
- 6OH-ABT 0,12 mM + FeNTA 1,0 mM + lumière

Ces études ont été effectuées à pH = 7,0 et l'irradiation est réalisée dans le photo-bioréacteur. La température est toujours égale à 30° C.

Les cinétiques de dégradation du 6OH-ABT dans ces conditions, établies par HPLC, sont présentées **Figure V.29**.

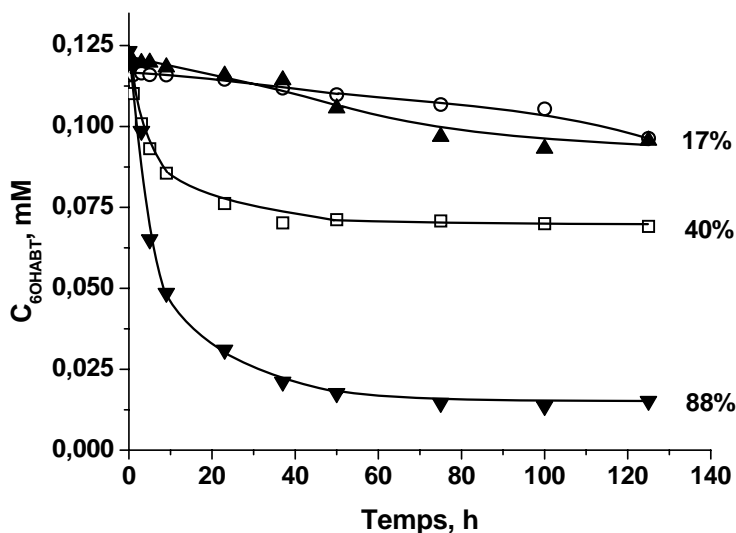


Figure V.29 : Cinétiques de dégradation du 6OH-ABT avec : (□) FeNTA 0,2 mM et lumière ; (○) FeNTA 0,2 mM en absence de lumière ; (▲) lumière ; (▼) FeNTA 1,0 mM et lumière.

On peut remarquer que la diminution du 6OH-ABT, pour une concentration de FeNTA 1,0 mM, est plus élevée par rapport à celle de 0,2 mM en présence de lumière. Ce résultat montre le rôle important de photoinducteur que joue le complexe de fer. Nous observons une disparition lente du 6OH-ABT (17%) en présence de FeNTA seul ou de lumière seule. Ce résultat similaire dans ces deux conditions est assez surprenant et nous amène à penser que ce composé est instable thermiquement. Pour confirmer cette hypothèse, nous avons vérifié l'influence de la température en comparant par HPLC deux solutions aqueuses de 6OH-ABT avant et après stérilisation dans un autoclave à 121°C pendant environ 40 min. Le pic qui correspond au 6OH-ABT est deux fois plus petit après chauffage à 121°C (**Figure V.30**).

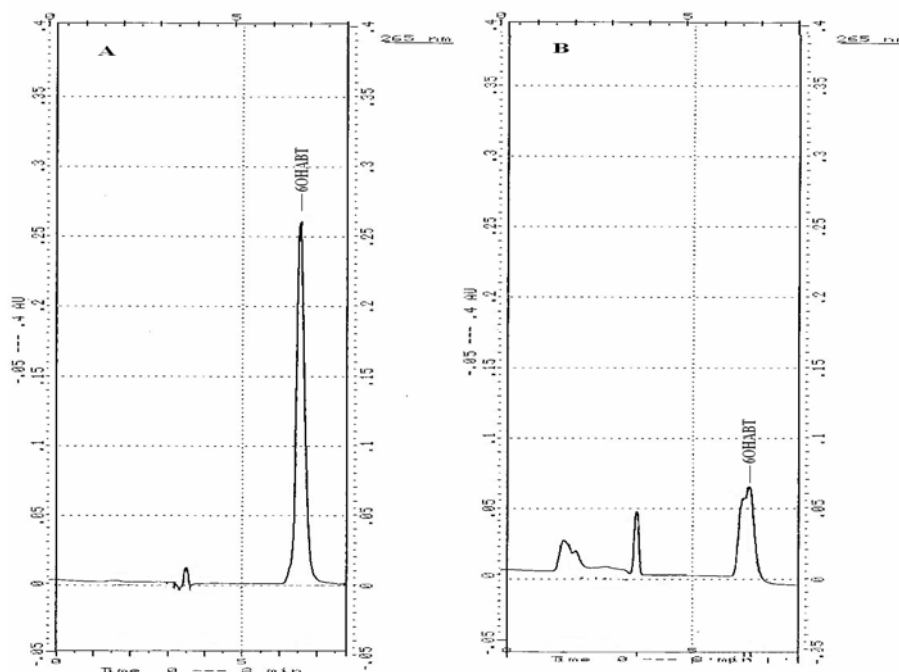


Figure V.30 : Solution du 6OH-ABT (0,12 mM). (A) avant et (B) après autoclavage. (Conditions HPLC isocratiques).

D'après ce résultat, on peut dire que la lumière seule ou le FeNTA seul n'ont pas d'effet significatif sur la dégradation du 6OH-ABT. Cette dégradation est due à une instabilité du 6-OHABT en solution aqueuse, instabilité qui est accentuée par une augmentation de température. Il faudrait cependant vérifier cette instabilité dans nos conditions d'incubation.

V.1.5.3 Photo et biodégradation du 6OH-ABT : systèmes simples et combinés

La dégradation du 6OH-ABT a été étudiée dans des conditions similaires à celles de la dégradation du ABT :

- 6OH-ABT 0,12 mM + bactéries
- 6OH-ABT 0,12 mM + bactéries + lumière
- 6OH-ABT 0,12 mM + bactéries + FeNTA 1,0 mM
- 6OH-ABT 0,12 mM + bactéries + FeNTA 1,0 mM + lumière

Les cinétiques de dégradation, établies par HPLC, dans ces systèmes sont présentées dans la **Figure V.31**. En présence de bactéries seules, nous observons une dégradation du 6OH-ABT correspondant à 17%. Si l'on rajoute la lumière ce pourcentage de dégradation passe à 52%. Dans ce cas on voit, contrairement aux expériences réalisées avec ABT, que la lumière a un effet positif sur la dégradation du 6OH-ABT. Ce résultat est cohérent avec les

cinétiques d'évolution du 6OH-ABT lors de la dégradation d'ABT (**Figure V.10**). Ce résultat ne peut pas être expliqué par une dégradation photochimique du 6OH-ABT, comme nous l'avons montré au paragraphe précédent, mais bien par la combinaison positive des deux éléments bactéries et lumière. De plus, les 17% de dégradation du 6OH-ABT en présence de bactéries correspondent à la dégradation observée thermiquement, donc les bactéries seules ne semblent pas avoir d'effet significatif sur la dégradation du 6OH-ABT. Cela est en accord également avec l'accumulation du 6OH-ABT observée dans le système cellules seules pour la dégradation d'ABT.

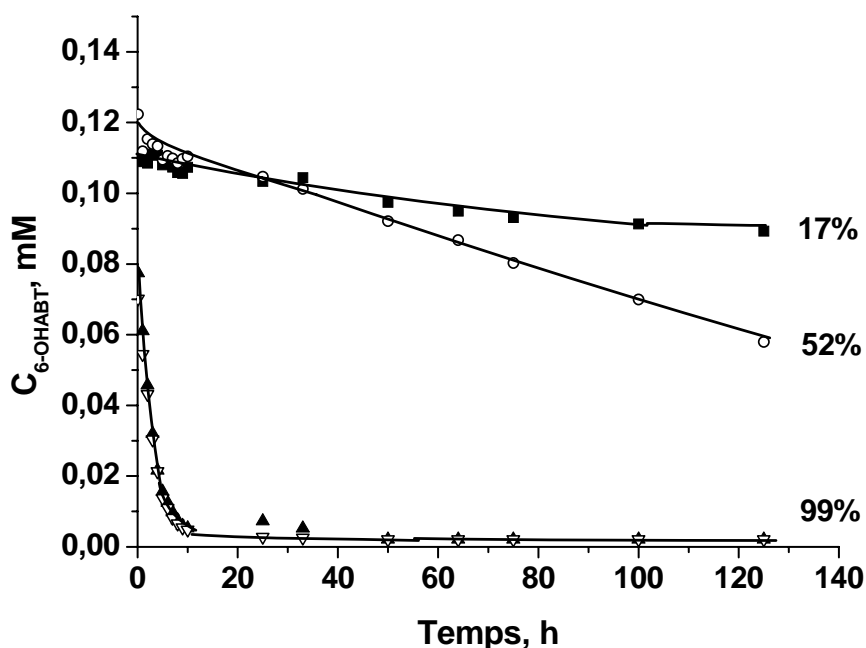


Figure V.31 : Cinétiques de dégradation du 6OH-ABT par *Rhodococcus rhodochrous* dans différentes conditions : (■) bactéries ; (○) bactéries et lumière ; (▲) FeNTA et bactéries ; (▽) FeNTA, bactéries et lumière. ($[6OH-ABT] = 0,12 \text{ mM}$; $[FeNTA] = 1,0 \text{ mM}$).

Dans les systèmes bactéries + FeNTA en présence et en absence de lumière, la dégradation du 6OH-ABT est très rapide pour atteindre une dégradation presque complète au bout de 40 h. La durée de demie-vie pour le 6OH-ABT dans le système le plus efficace « bactéries et complexe du fer avec ou sans lumière » est de 2 heures par rapport à 125 heures pour le système « bactéries-lumière sans complexe de fer ». Ces résultats sont similaires à ceux obtenus lors de la dégradation d'ABT. Le rôle positif du complexe de fer sur l'efficacité de dégradation de *Rhodococcus rhodochrous* est évident dans le cas du 6OH-ABT.

V.1.7 Impact du fer sur le métabolisme cellulaire

V.1.7.1 Devenir du FeNTA lors des processus de photodégradation

Afin d'aller plus loin dans la compréhension des mécanismes impliqués lors des dégradations en présence du complexe de fer, nous avons suivi le devenir du FeNTA par RMN du proton *in situ*. Il est connu que le complexe FeNTA peut photochimiquement se dégrader par un processus de photooxydoréduction en donnant du fer ferreux, de l'IDA (acide iminodiacétique), de la glycine, du formaldéhyde et de l'acide formique comme photoproduits majoritaires (Abida *et al.*, 2006). Nous avons retrouvé ces produits organiques dans les analyses par RMN (**Figure V.32A et B**).

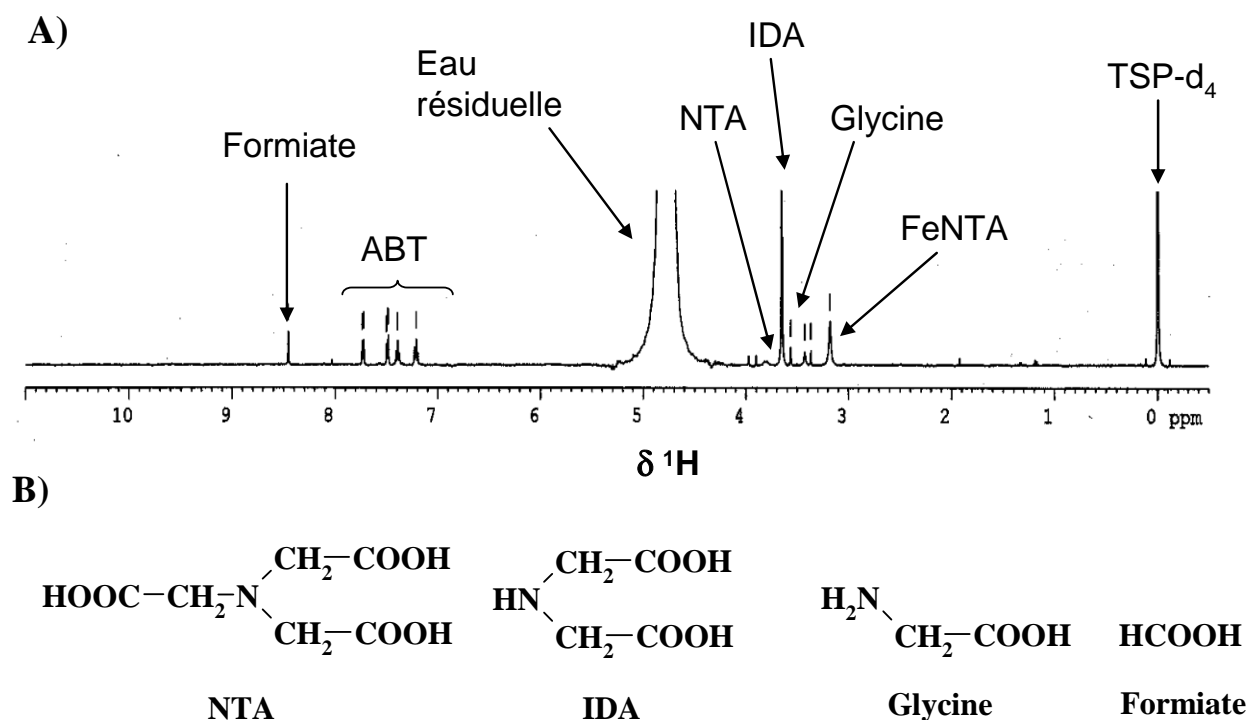


Figure V.32 : A) Spectre RMN ^1H d'un échantillon contenant ABT (0,5 mM) et FeNTA (1,0 mM) après 50 h d'incubation et d'irradiation, B) Formule des produits de dégradation du FeNTA.

La présence de formaldéhyde a été mise en évidence par dosage compléxométrique (Andrianirinarivelo *et al.*, 1993). En effet, il est très difficile de l'observer en RMN car son pic (4,8 ppm) est masqué par celui de l'eau. On observe que les signaux du FeNTA et du TSPd₄ sont très élargis (150 Hz pour le FeNTA), cet élargissement est dû à la présence du fer paramagnétique.

De plus, nous nous sommes rendu compte au cours de cette étude que les variations de pH induisent une modification des déplacements chimiques de ces différents composés (NTA,

IDA et glycine). Nous avons donc réalisé des courbes de titration de ces trois composés en mélange en fonction du pH (*Figure V.33*).

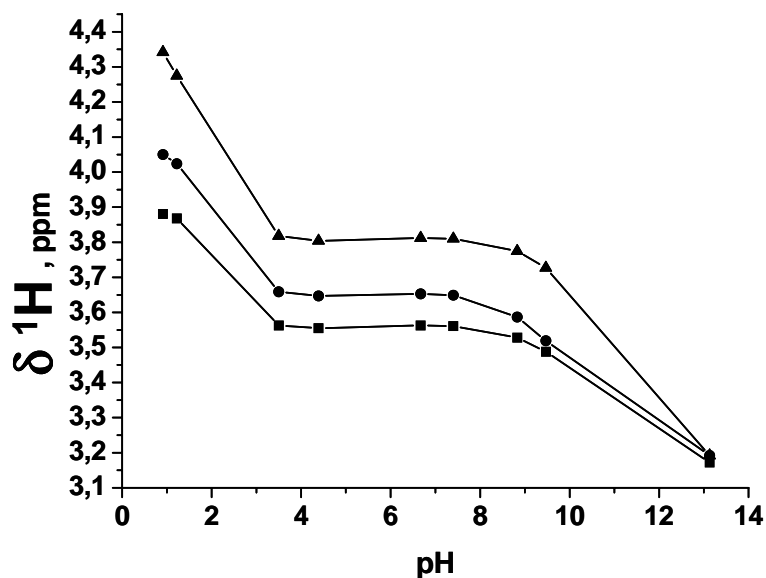


Figure V.33 : Courbes de titration de la glycine (■), de l'IDA (●) et du NTA (▲) en fonction du pH établies par RMN du proton.

Il est clair que dans la zone comprise entre 4,0 et 8,0 unités de pH, les trois signaux sont bien séparés et ont un déplacement chimique constant. Un exemple de spectre RMN enregistré sur un échantillon à pH 7,4 est présenté dans la *Figure V.34*.

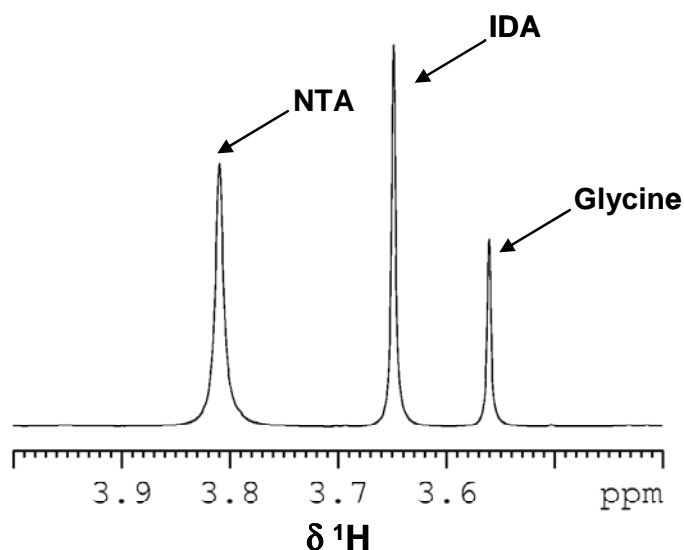


Figure V.34 : Spectre RMN du proton d'un mélange de glycine, IDA et NTA à pH 7,4.

Pour éviter les problèmes liés à la présence du fer (élargissement des signaux) et aux modifications de déplacements chimiques liées aux variations de pH, nous avons alors traité

par la suite nos échantillons selon le protocole décrit dans la partie Matériel et Méthodes. En résumé, le fer est d'abord précipité à pH alcalin (pH=13), éliminé ensuite par centrifugation puis le pH de l'échantillon est ajusté à pH=7.

Pour simplifier le problème, nous nous sommes intéressés dans un premier temps au devenir du FeNTA sans polluant en présence de lumière et sans cellules. Dans les **Figures V.35** et **V.36** est représentée l'évolution suivie par RMN *in situ* de la glycine, de l'IDA, du NTA et du formiate lors de l'irradiation du FeNTA seul dans la solution.

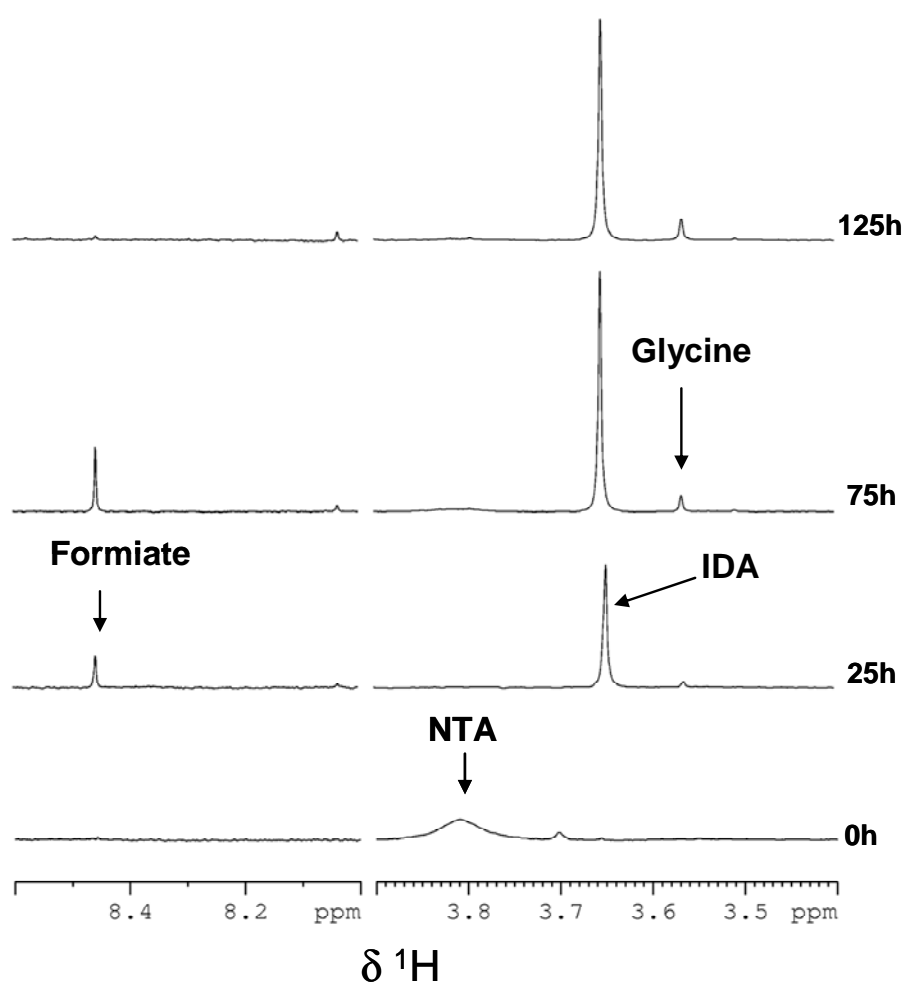


Figure V.35 : Exemple de l'évolution d'une solution de FeNTA en fonction du temps d'irradiation analysée par RMN ^1H .

Le dosage de NTA est sans doute sous estimé car à $t = 0$, nous ne retrouvons que 0,3 mM de NTA au lieu des 1 mM de départ (**Figure V.36**). Ce problème est dû au fait que le pic de NTA est encore large montrant que le fer n'a pas été complètement précipité malgré le protocole mis en place (**Figure V.35**). Cependant les signaux des autres composés analysés sont fins et ne semblent pas être influencés par la présence de fer restant.

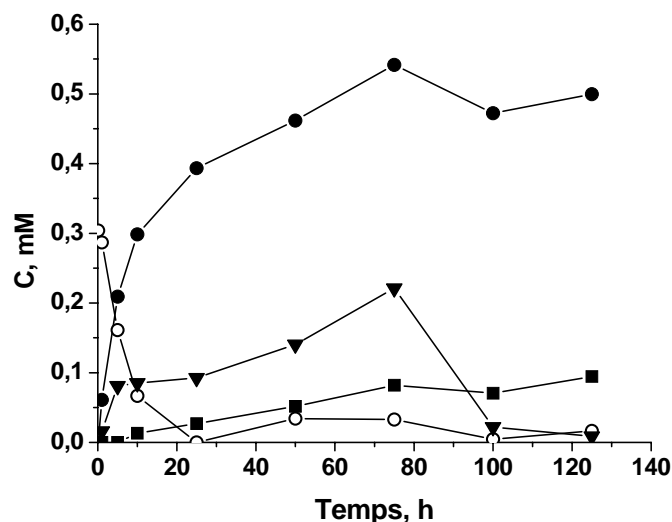


Figure V.36 : Evolution des concentrations en NTA (O), IDA (●), glycine (■) et formiate (▼) mesurées par RMN du proton lors de l'irradiation du FeNTA seul.

L'acide iminodiacétique (IDA) s'accumule au cours du temps d'irradiation jusqu'à une concentration d'environ 0,5 mM. La glycine atteint une concentration d'environ 0,1 mM et le formiate est formé puis décomposé en fin de cinétique sans doute sous forme de CO_2 .

V.1.7.2 Devenir du FeNTA lors du processus de photo-biodégradation

La même expérience (dégradation du FeNTA) a été réalisée avec des cellules en présence et en absence de lumière. L'évolution de la concentration en NTA est présentée dans la **Figure V.37a** et celle de l'IDA dans la **Figure V.37b**.

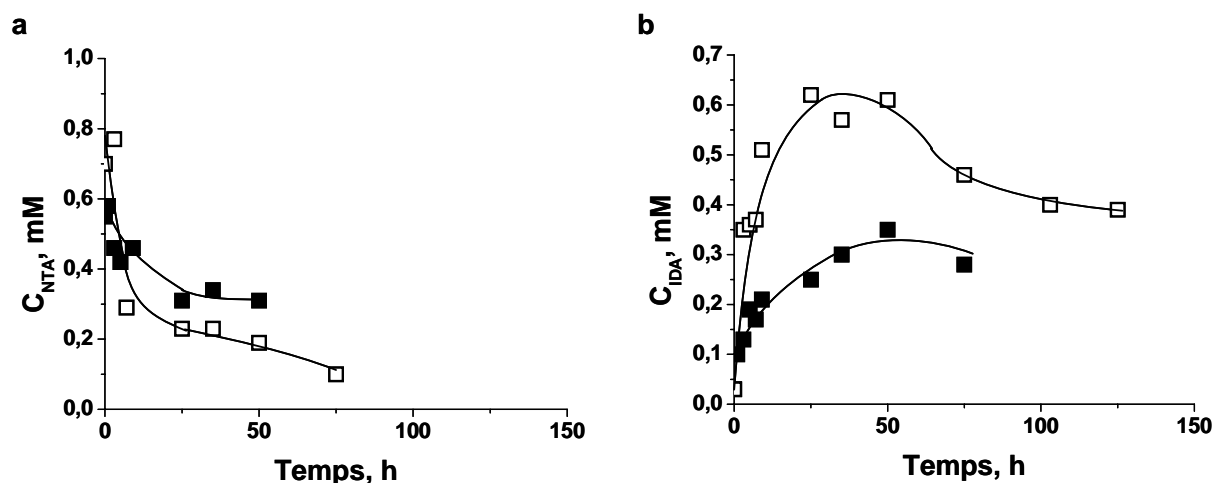


Figure V.37 : Evolution des concentrations en NTA (a) et IDA (b) mesurées par RMN du proton dans les systèmes avec (□) ou sans irradiation (■) de FeNTA en présence de bactéries. $[\text{FeNTA}] = 1,0 \text{ mM}$.

Ces résultats montrent que le complexe FeNTA peut être métabolisé par les cellules. La combinaison de la lumière et des bactéries accélère la dégradation de FeNTA et conduit à une formation plus importante d'IDA. Ce résultat doit s'expliquer par l'action simultanée de la lumière et du métabolisme sur la transformation du FeNTA. Dans ces deux expériences, ni formiate, ni glycine ne sont visibles sur le spectre RMN ^1H contrairement à ce qui avait été observé en présence de lumière seule (**Figure V.35**). En fait, la glycine et le formiate sont des substrats potentiels des microorganismes. Nous avons donc testé leur dégradation avec les mêmes cellules de *Rhodococcus*. La **Figure V.38** présente les cinétiques de dégradation de la glycine et du formiate par les bactéries. Au bout d'une heure, les deux substrats sont complètement dégradés.

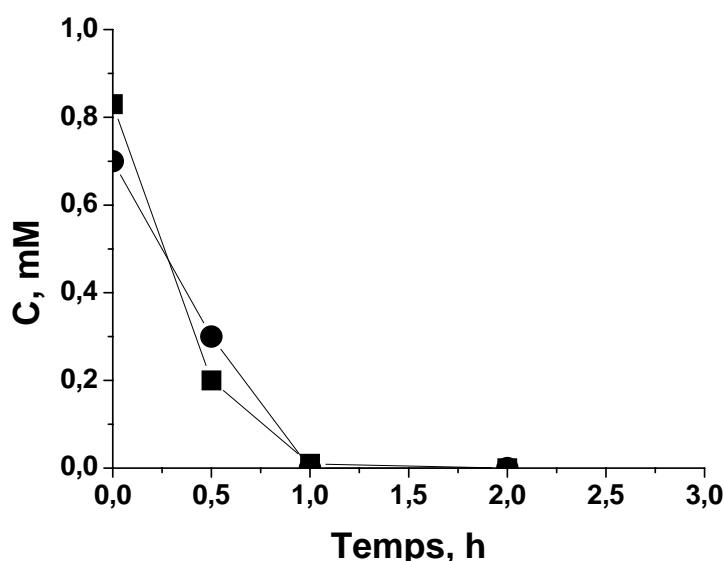


Figure V.38 : Evolution de la concentration en glycine (●) et en formiate (■) mesurée par RMN du proton lors de l'incubation avec des cellules. Glycine 1,0 mM, formiate 1,0 mM, pH 7,0.

Remarque : Les deux substrats ont été incubés indépendamment.

Ces résultats sont en bon accord avec ceux obtenus par RMN du proton lors de la dégradation d'ABT dans des systèmes combinés. Dans la **Figure V.39A**, on voit clairement le formiate s'accumuler lors de la photodégradation de l'ABT en présence de FeNTA. Au contraire, la concentration en formiate est très faible dans la **Figure V.39B** lors de l'incubation d'ABT avec des cellules de *Rhodococcus rhodochrous* et du FeNTA. En effet, dans ce cas, même si le formiate et la glycine se forment à partir du FeNTA, ils sont rapidement métabolisés par les cellules.

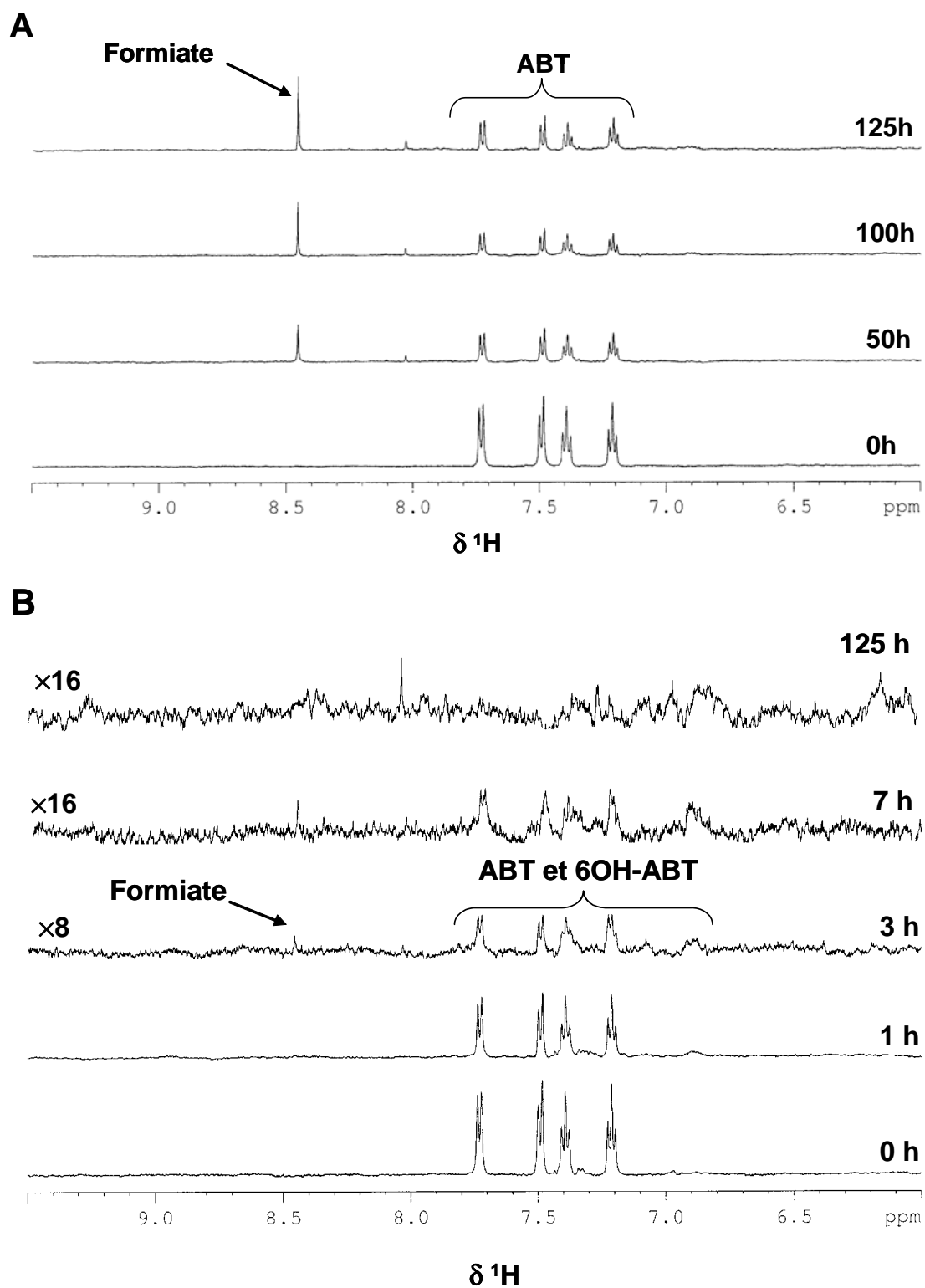


Figure V.39 : Spectres RMN ^1H in situ enregistrés lors de la dégradation d'ABT sous irradiation en présence de FeNTA (A) et en présence de FeNTA et de cellules de *Rhodococcus rhodochrous* (B).

Ce résultat montre que le FeNTA est transformé par les cellules seules. Il a déjà été montré que FeNTA pouvait être transporté dans le cytoplasme puis métabolisé en conditions aérobies par certaines cellules (Buchelli-Witschell et Egli, 2001). De plus, il faut remarquer que cette transformation est augmentée en présence de lumière *via* le mécanisme de photooxydoréduction.

En parallèle, nous avons également suivi le devenir du ligand NTA non complexé au fer en présence de cellules avec et sans lumière (*Figure V.40*).

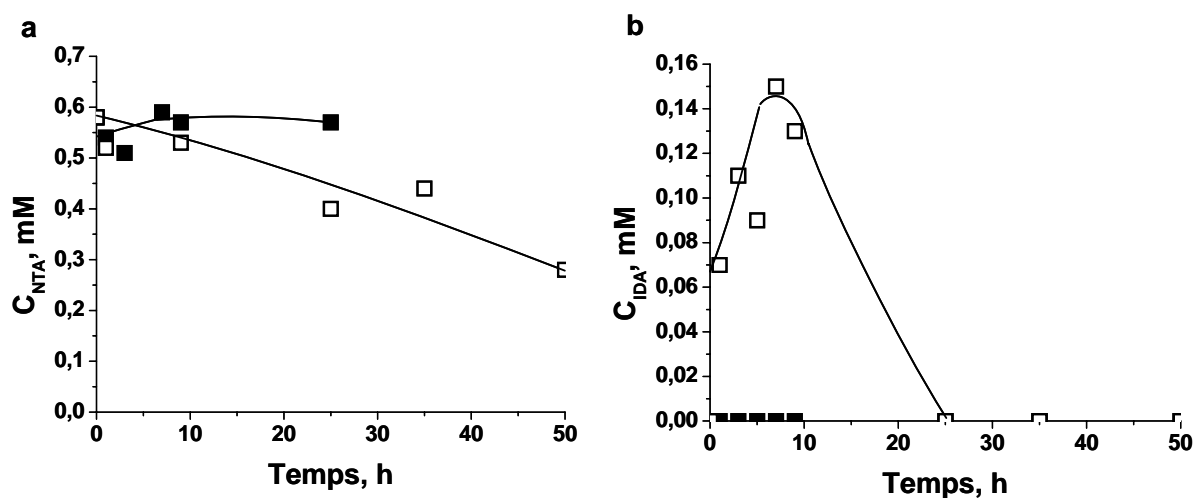


Figure V.40 : Evolution des concentrations en NTA (a) et IDA (b) mesurées par RMN du proton lors de l'incubation de NTA avec *Rhodococcus rhodochrous* ; (\square) sous irradiation ; (\blacksquare) absence de lumière. [NTA]=1,0 mM

NTA n'est pas métabolisé par les cellules en absence de lumière. Ce résultat semble indiquer que seul le complexe est transporté ou métabolisé dans la cellule et non pas le ligand isolé (Bucheli-Witschell et Egli, 2001). La littérature n'est pas claire sur le problème du transport mais l'enzyme dégradant le FeNTA en IDA requiert la présence d'un complexe métallique (Egli, 2001). Par contre en présence de lumière et de cellules, NTA est faiblement dégradé.

V.1.7.3 Suivi du fer lors des processus de photo-biodégradation

Afin de comprendre l'effet du fer sur le métabolisme bactérien, nous avons dosé le fer lors des différentes expériences.

V.1.7.3.1 Dosage du fer total en solution aqueuse

Dans les systèmes de dégradation de l'ABT, le dosage du fer a été réalisé au temps $t=0$ et pour le temps final (125 h). Les résultats sont présentés dans le **Tableau V.5** :

Temps d'incubation	ABT + FeNTA	ABT + FeNTA + lumière	ABT + FeNTA + cellules	ABT + FeNTA + cellules + lumière
	Concentrations de fer soluble (mM)			
0 h	0,88	0,84	0,74	0,36
125 h	0,72	0,64	0,50	0,15
% de disparition	18%	23%	43%	59%

Tableau V.5 : Dosage du fer en solution dans les systèmes de dégradation d'ABT avec FeNTA. $[ABT]=0,5 \text{ mM}$; $[FeNTA]=1,0 \text{ mM}$; $pH = 7,0$.

On remarque une disparition du fer en solution beaucoup plus importante en présence de cellules. Ce résultat peut être expliqué soit par une adsorption à la surface des cellules, soit par une internalisation du fer dans les cellules. L'incorporation du fer dans les cellules est possible par transport soit du fer seul après décomplexation, soit du complexe FeNTA (Bucheli-Witschel et Egli, 2001). Cette disparition du fer en solution est accélérée en présence de lumière. Ce phénomène peut résulter de la libération du fer (sous forme de Fe(II) fer ferreux) lors du mécanisme de photooxydoréduction qui induit également la dégradation du ligand NTA (Andrianirinaharivelo *et al.*, 1993). Dans le cas des systèmes contenant à la fois la lumière et les cellules, le Fe(II) peut être plus facilement incorporé par les bactéries.

Les mêmes dosages de fer ont été réalisés dans les systèmes avec le 6OH-ABT (**Figure V.41**). Dans le cas du 6OH-ABT, on retrouve les mêmes tendances de disparition du fer en solution. Dans le cas de FeNTA seul en solution, nous observons 9% de diminution du fer sous irradiation. En présence de cellules seules, ce pourcentage de disparition du fer passe à 34% et il est de 91% avec les bactéries et la lumière combinée.

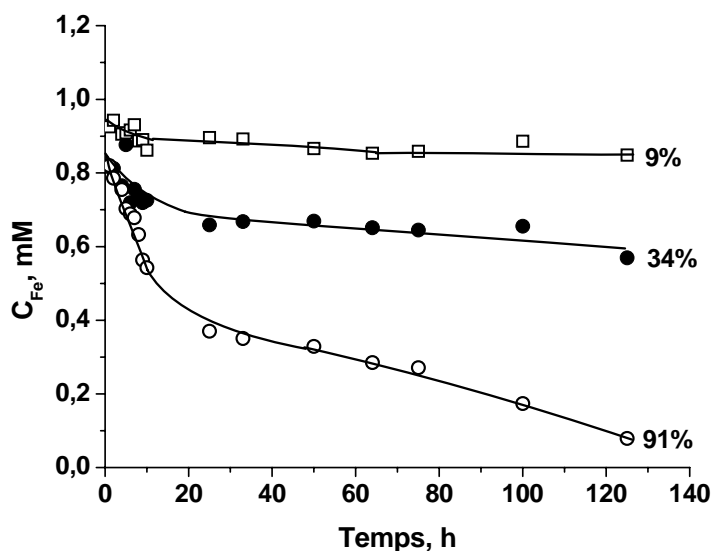


Figure V.41 : Dosage du fer en solution dans le système de dégradation du 6OH-ABT par FeNTA avec lumière (□) ; FeNTA et bactéries (●) ; FeNTA, bactéries et lumière (○).

Enfin le fer a été dosé lors de l'incubation du FeNTA sans ABT avec des cellules de *Rhodococcus rhodochrous* en présence ou en absence de lumière (**Figure V.42**).

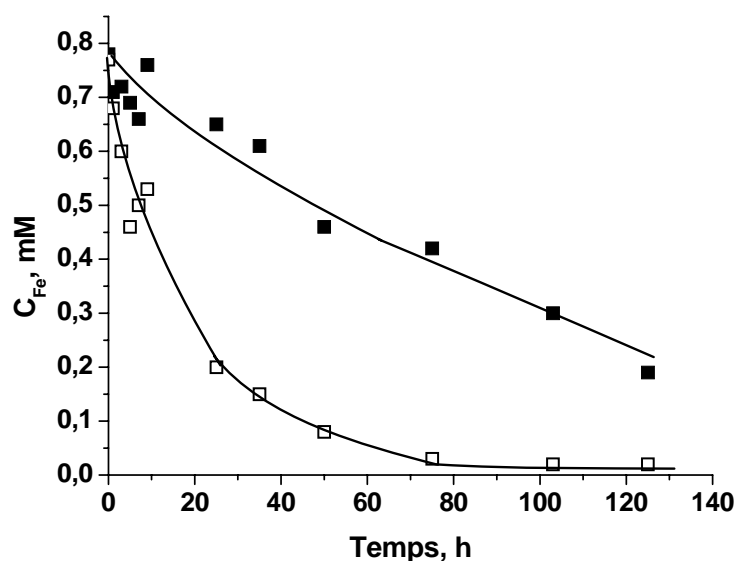


Figure V.42 : Evolution du fer dans les surnageants du système FeNTA + bactéries irradié (□) et non irradié (■).

La concentration du fer en solution diminue au cours du temps en présence de cellules alors qu'elle est stable en absence de cellules. Cette diminution est plus importante en présence de lumière. Le mécanisme de photooxydoréduction, impliquant la décomplexation de FeNTA et simultanément la réduction du Fe(III) en Fe(II), semble favoriser l'incorporation du fer dans les cellules.

En conclusion nous avons montré que suivant les conditions expérimentales, la présence de cellules entraîne une diminution du fer total soluble. Cette diminution est encore plus marquée si l'on ajoute la lumière.

V.1.7.3.2 Dosage du fer dans les différents compartiments cellulaires

Dans le but de mieux comprendre le rôle du fer sur le métabolisme cellulaire, nous avons suivi le fer dans les différents compartiments du système. En effet, nous avons observé précédemment d'une part que la concentration du fer soluble diminuait au cours du processus d'incubation et d'autre part que le complexe de fer FeNTA était métabolisé par les cellules. Nous avons donc voulu savoir si le fer est adsorbé et/ou internalisé par les cellules. Le protocole, adapté de Bezkorovainy *et al.* (1986), est présenté dans la **Figure V.43**.

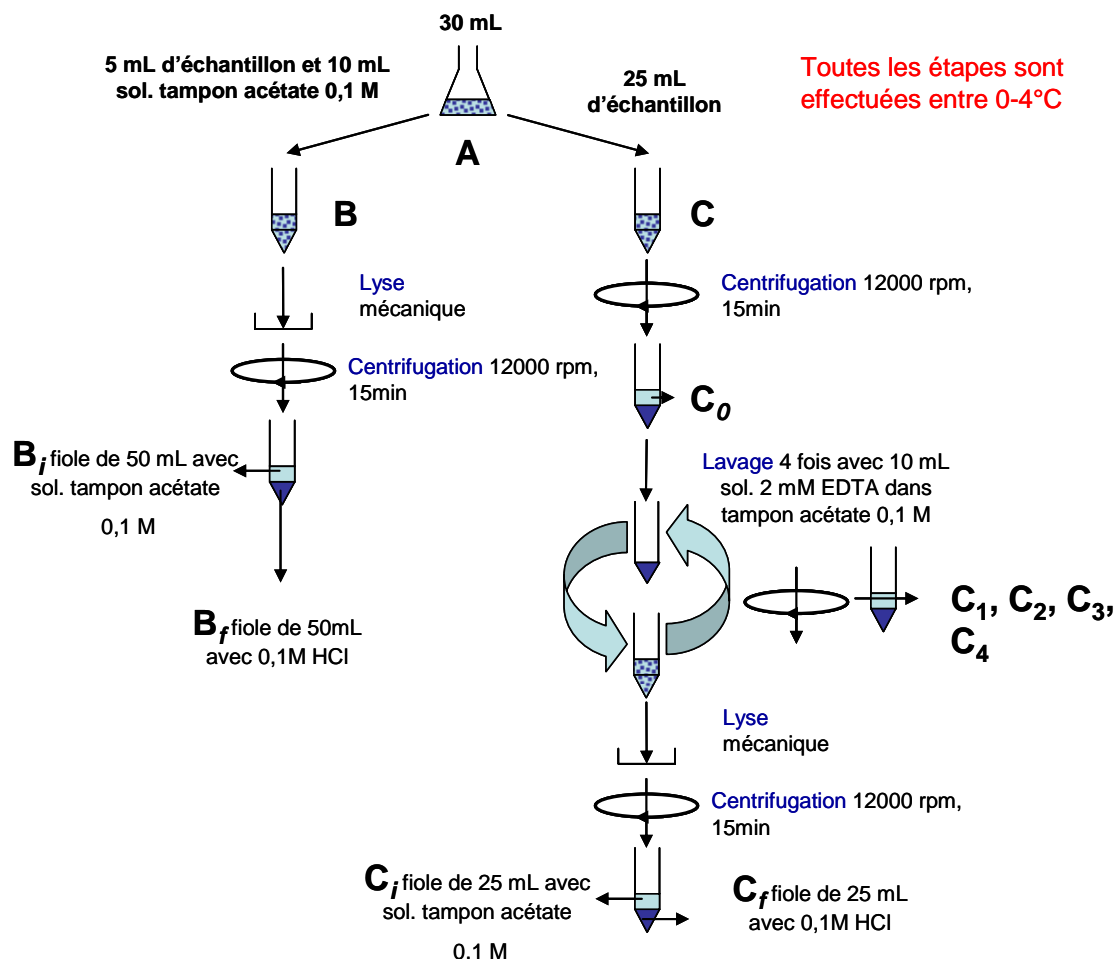


Figure V.43 : Protocole utilisé pour doser le fer dans les compartiments intra- et extracellulaires.

Après 125 h d'incubation des cellules en présence d'ABT et de complexe de fer, le mélange est partagé en deux fractions. La première fraction (Voie B) est utilisée pour doser le

fer total ($B_i + B_f$) c'est-à-dire le fer soluble, le fer adsorbé à la surface des cellules et le fer intracellulaire. La lyse mécanique permet de libérer en solution le fer intracellulaire. Le fer est ensuite dosé dans la solution et dans les débris cellulaires après addition de HCl pour faciliter la dissolution du fer. La deuxième fraction (Voie C) est utilisée pour doser le fer séparément dans les différents compartiments : i) le fer soluble C_0 est dosé dans le surnageant obtenu après centrifugation de la suspension microbienne ii) le fer adsorbé C_1 à C_4 est dosé après lavage du culot bactérien par une solution d'EDTA qui est un fort agent complexant du fer iii) le fer intracellulaire ($C_i + C_f$) est dosé après lyse du culot cellulaire. Il faut noter que toutes ces manipulations sont réalisées au froid (4 °C) car dès que l'on atteint la température de 10 °C, le fer peut être transporté activement par les cellules (Bezkorovainy *et al.*, 1986).

Les concentrations de fer présent dans les différents compartiments sont présentées dans le **Tableau V.6**.

	[ABT] 0,5 mM [FeNTA] 1 mM + bactéries	[ABT] 0,5 mM [FeNTA] 1 mM + bactéries + lumière
Voie B		
B_i	0,42 mM	0,41 mM
B_f	0,33 mM	0,55 mM
Total	0,750 mM	0,960 mM
Voie C		
C_0	0,290 mM	0,094 mM
Fer soluble	0,290 mM	0,094 mM
C_1	0,039 mM	0,065 mM
C_2	0,031 mM	0,051 mM
C_3	0,029 mM	0,031 mM
C_4	0,002 mM	0,002 mM
Fer adsorbé	0,101 mM	0,149 mM
C_i	0,039 mM	0,041 mM
C_f	0,092 mM	0,140 mM
Fer intracellulaire	0,131 mM	0,181 mM
Total	0,522 mM	0,424 mM

Tableau V.6 : Dosage du fer total dans les solutions correspondant aux différents traitements chimiques effectués sur le surnageant de dégradation (après 125 h d'incubation).

Les résultats des dosages de fer dans les différents compartiments montrent un déficit important en fer au niveau des dosages de la voie C. Ce problème est certainement dû à l'addition d'EDTA qui ne permet pas de doser le fer correctement dans nos conditions habituelles, l'EDTA étant un fort agent complexant du fer. Un nouveau protocole de dosage du fer en présence d'EDTA devra être mis en place pour palier ce problème. Cependant cette expérience montre qu'une partie du fer (environ 16%) se retrouve à l'intérieur de la cellule

après 125 h d'incubation en présence de FeNTA 1,0 mM. Le dosage du fer total dans les cellules témoins, c'est-à-dire non incubées avec du FeNTA, montre que la concentration intracellulaire est très faible, en dessous de la limite de détection de notre méthode d'analyse. Ceci montre donc qu'une partie non négligeable du fer est bien internalisée par les cellules lorsqu'elles sont en présence de FeNTA.

V.1.7.4 Biodégradation d'ABT avec des cellules cultivées en présence de fer (FeNTA)

Nous avons mis en évidence précédemment que le métabolisme bactérien était fortement activé en présence de complexes de fer. D'autre part, une partie du fer est intégrée par les cellules. La question se pose donc de savoir si les cellules ne sont pas carencées en fer. Pour cela nous avons cultivé des cellules en présence de fer puis après lavage des cellules, nous avons procédé à une expérience de biodégradation classique d'ABT (*Figure V.44*).

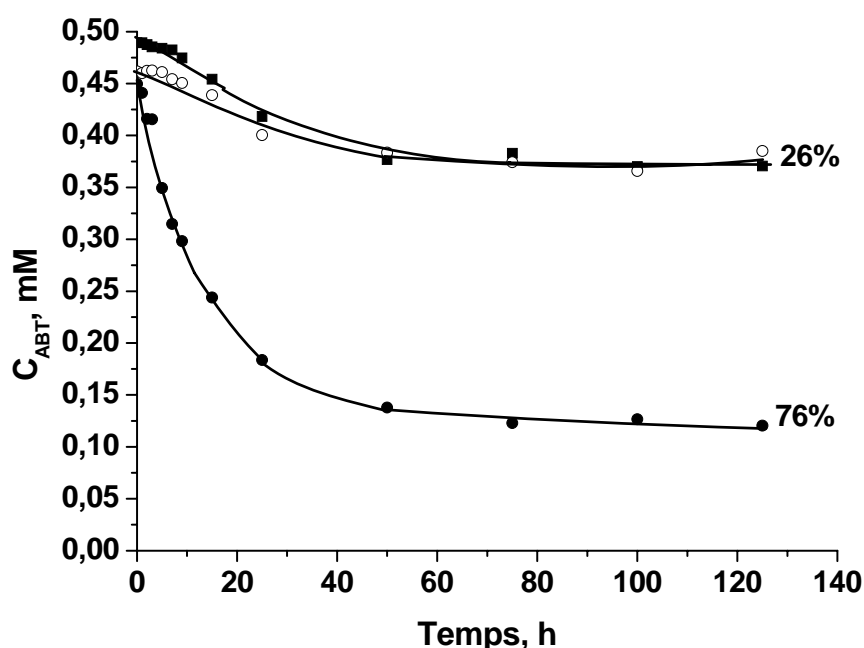


Figure V.44 : Dégradation d'ABT (0,5 mM) avec des cellules (■) cultivées en présence de FeNTA (0,1 mM), (○) cultivées sans FeNTA, (●) cultivées sans FeNTA et incubées en présence de FeNTA 0,1 mM.

Le fait de cultiver les cellules en présence de fer ne joue pas sur la vitesse de dégradation d'ABT. Les cellules ne semblent pas carencées en fer ou bien à la concentration utilisée (0,1 mM) et dans le milieu de culture, le FeNTA ne peut pas être intégré par les cellules. Pour avoir une réponse systématique de cette expérience de culture des cellules, il aurait fallu doser le fer dans le milieu au début et à la fin de la culture.

V.1.8 Discussion

Les résultats ont montré qu'ABT ne subit pas de photolyse directe dans notre incubateur et que la lumière a un effet légèrement inhibiteur sur le métabolisme bactérien. Dans cette discussion, nous considérerons donc seulement les trois systèmes de dégradation d'ABT (0,5 mM) suivant:

- 1) Photochimique (FeNTA (1,0 mM) + lumière)
- 2) Microbiologique (*Rhodococcus rhodochrous* OBT18)
- 3) Combiné (*Rhodococcus rhodochrous* OBT18 + FeNTA (1,0 mM) \pm lumière)

V.1.8.1 Evaluation de l'efficacité des systèmes

L'efficacité de transformation d'ABT par ces trois systèmes est présentée dans le **Tableau V.7** :

	1) Photochimique	2) Microbiologique	3) Combiné
% d'ABT transformé après 125h d'expérience	37	26	99 (après 25h)

Tableau V.7 : Pourcentage de transformation d'ABT dans les trois systèmes

La transformation d'ABT dans le système combiné est beaucoup plus efficace que dans les systèmes séparés. Le même résultat est obtenu avec et sans lumière ce qui montre un effet majeur des complexes de fer sur l'activité microbienne. Il faut tout de même souligner que la lumière a un effet sur les cinétiques de formation puis de disparition des intermédiaires (6OH-ABT). Cependant il est difficile de conclure s'il s'agit d'une diminution de la formation du 6OH-ABT ou d'une augmentation de sa disparition en présence de lumière.

L'effet des complexes de fer sur la transformation d'ABT et du 6OH-ABT a été analysé plus en détail en faisant varier la concentration de ces complexes dans le système combiné sans lumière. Les résultats sont résumés dans le tableau suivant :

Concentration en FeNTA (mM)	0,1	0,25	0,5	1,0
% d'ABT transformé après 125h	76	89	94 après 25h	99 après 25h
Concentration de 6OH-ABT (mM) restant après 125h	0,12	0,06	0,035	0,015

Tableau V.8 : Pourcentage de transformation d'ABT et concentration de 6OH-ABT restant après 125h d'expérience en fonction de la concentration de FeNTA.

Ce tableau montre l'impact important du complexe sur le métabolisme microbien pour la transformation d'ABT. En effet, plus la concentration de complexe de fer augmente, plus la transformation d'ABT est efficace. Cependant, dans nos conditions expérimentales, à partir de 0,5 mM en complexe de fer, l'ajout supplémentaire de FeNTA n'a pas d'effet significatif pour ABT. Par contre, si l'on regarde le métabolite majoritaire (6OH-ABT), sa concentration continue à diminuer avec l'augmentation du complexe de 0,5 à 1,0 mM. Ce résultat montre que le fer présent en solution est également capable d'activer l'enzyme qui permet de transformer le 6OH-ABT. De plus, il est cohérent avec les expériences réalisées directement sur le 6OH-ABT comme substrat de départ où l'on retrouve une importante augmentation de sa transformation en présence de complexes de fer et de microorganismes.

V.1.8.2 Comparaison des voies de dégradation photochimique et microbiologique

La **Figure V.45** schématise l'ensemble des voies de dégradation observées dans ces trois systèmes.

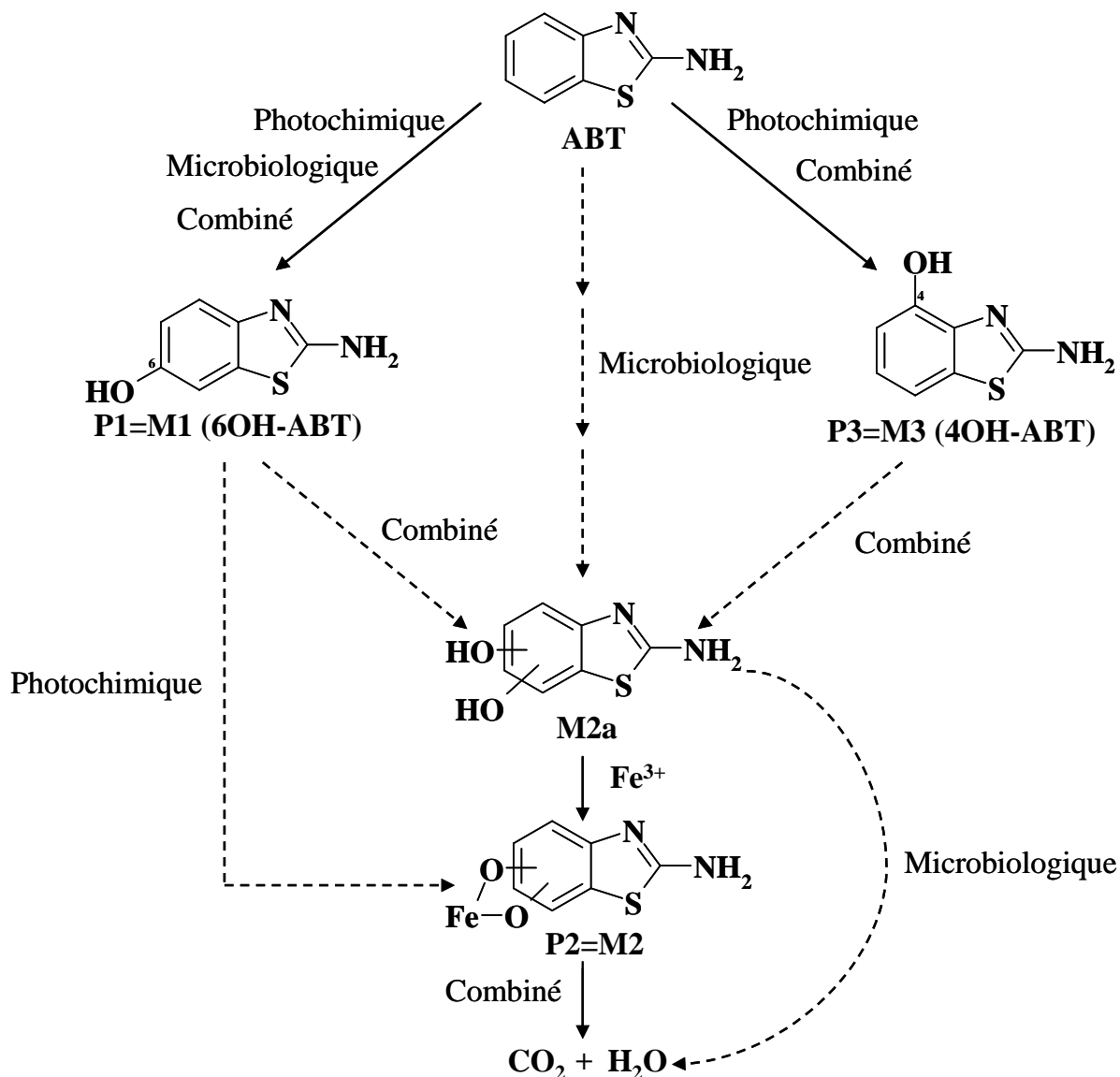


Figure V.45 : Voies de dégradation d'ABT par les processus simples et combinés.

1) Photochimiquement l'ABT est transformé (37% en 125h d'irradiation) majoritairement en 6OH-ABT mais aussi en 4OH-ABT. La dégradation s'arrête à ce stade d'avancement, une très faible dégradation du 6OH-ABT est ensuite observée. Cependant les expériences réalisées avec le 6OH-ABT comme substrat de départ montrent que ce composé est bien photodégradé en présence de FeNTA. Ce résultat montre que le complexe FeNTA est un bon photoinducteur pour la dégradation de différents composés organiques mais que nous

sommes dans des conditions limitantes pour continuer la dégradation. En effet, le mécanisme de photooxydoréduction à partir du complexe FeNTA conduit à sa disparition (réduction du Fe(III) en Fe(II) et oxydation du ligand), à la formation de radicaux oxydants comme HO^\bullet , $\text{CO}_3^{\bullet-}$ qui vont pouvoir réagir sur le composé organique, et à la formation de formaldéhyde et d'acide iminodiacétique (IDA). Par analyse RMN, nous avons également pu détecter la présence du formiate provenant certainement de l'oxydation du formaldéhyde et de la glycine provenant de la dégradation de l'IDA (*Figure V.46*) :

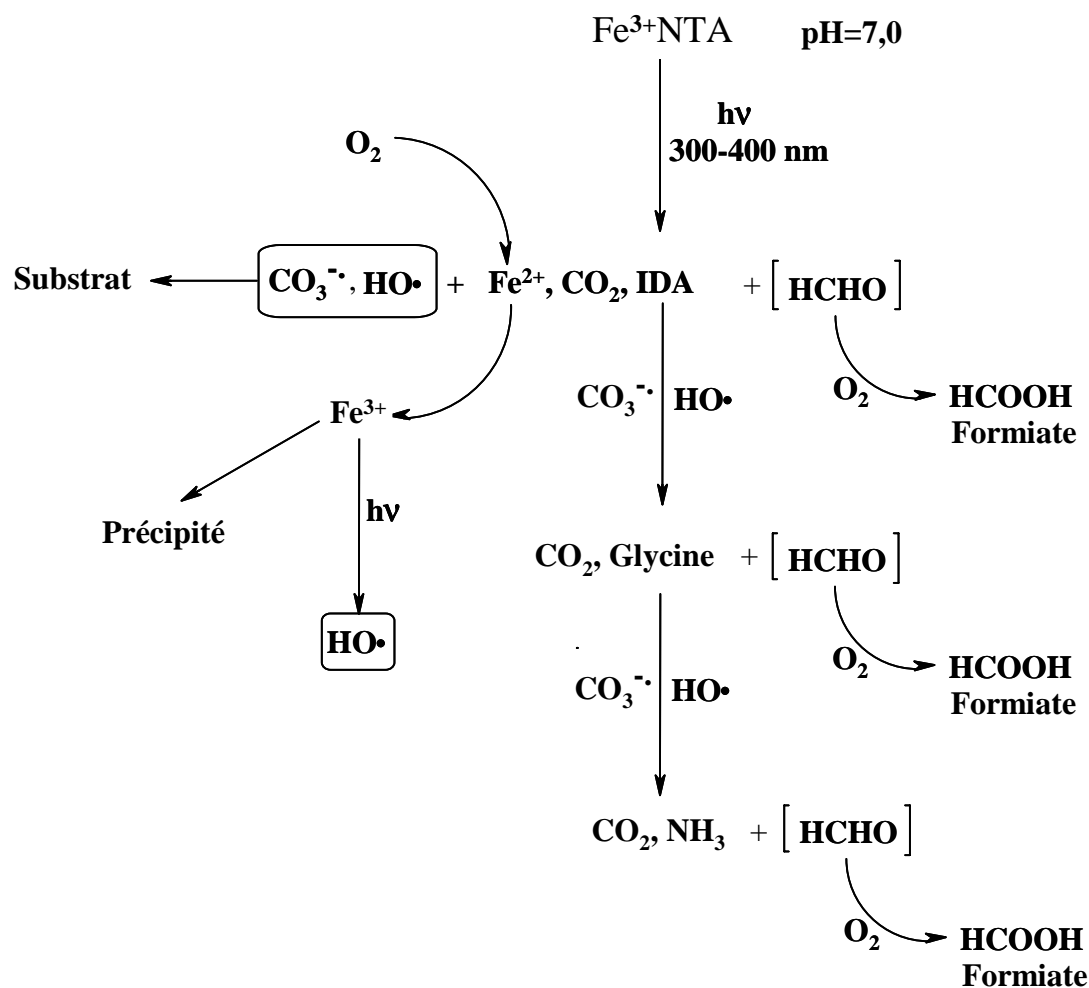


Figure V.46 : Processus de photodégradation du complexe FeNTA

Ce résultat (accumulation de 6OH-ABT) montre que le FeNTA n'est pas un photocatalyseur et qu'il n'y a pas de production en continu de radicaux oxydants. Donc, l'efficacité de la dégradation photochimique pour la suite du processus dépend de la capacité des photoproduits du NTA (IDA, glycine) à complexer le fer. En effet, la formation d'un nouveau complexe de fer permettrait de générer de nouveaux radicaux oxydants. Cependant, IDA complexe le Fe(III) pour des pH inférieurs à 3,5 et dans nos conditions expérimentales, l'IDA ne peut pas complexer le Fe(III) car nous sommes à environ pH 7,0

(Andrianirinarivelo *et al.*, 1993). La formation de glycine peut donc s'expliquer par la dégradation de l'IDA *via* les radicaux formés à partir du complexe FeNTA.

Photochimiquement on observe également un produit P2 dont le spectre UV-visible est compatible avec celui d'un catéchol complexant le fer. Cette hypothèse est tout à fait en accord avec la réactivité des radicaux hydroxyle sur les structures aromatiques qui conduit à deux hydroxylations successives puis à l'ouverture du noyau aromatique. De plus, en présence de fer, des produits de complexation entre le fer et les molécules de type catéchol ont été très souvent proposés (Brand *et al.*, 1998, 2000 ; Abida *et al.*, 2006).

2) Par le processus microbiologique seul, la dégradation de l'ABT (26% en 125h d'incubation) conduit très majoritairement à la formation du 6OH-ABT qui s'accumule dans le milieu. Ce résultat est cohérent avec l'expérience menée à partir du 6OH-ABT comme substrat de départ où aucune biodégradation n'est observée. Le 4OH-ABT n'a pas été observé dans ce processus. Ce résultat confirme des études précédentes menées au laboratoire SEESIB (Haroune *et al.*, 2001). Cette hydroxylation en position 6 du noyau aromatique est une étape commune à la biodégradation d'autres benzothiazoles (BT, OBT, MBT) par cette souche (Besse *et al.*, 2001, Haroune *et al.*, 2004). Un autre métabolite M2a, conservant la structure aromatique, a été mis en évidence. Ce métabolite n'est observé que dans les processus où le fer n'intervient pas. Comme on le verra plus loin en présence de FeNTA, M2a n'est plus observé; par contre on détecte un métabolite M2 identique à P2 dont le temps de rétention est relativement proche (4,17 et 4,25 min) par rapport à celui de M2a. Notre hypothèse est que le produit M2a est la forme non complexé au fer d'un catéchol dérivé de l'ABT. De plus pour étayer cette hypothèse nous savons que cette souche possède une enzyme de type catéchol 1,2-dioxygénase conduisant à un diacide produit d'ouverture du catéchol. Ceci a été observé avec le MBT (Haroune *et al.*, 2004).

3) Par le processus combiné, nous observons les trois produits de transformation :

- 6OH-ABT
- 4OH-ABT
- Complexe catéchol-fer

La combinaison des deux processus ne modifie pas les voies de transformation d'ABT obtenues dans les processus séparés. Cependant il faut signaler que dans le processus combiné sans lumière, le 4OH-ABT a été observé, ce qui n'était pas le cas dans le processus microbiologique seul. Cette différence est très certainement due à l'avancée beaucoup plus importante de la transformation d'ABT en présence de FeNTA, ce qui nous a permis de

détecter ce métabolite présent à faible concentration (maximum obtenu 0,011 mM dans le processus combiné).

Cette étude a montré que les voies de transformation d'ABT étaient finalement identiques que ce soit par photodégradation ou par biodégradation.

V.1.8.3 Pourquoi l'activation par le fer ?

Photochimiquement nous avons mis en évidence le rôle important que peut jouer le complexe FeNTA pour la dégradation d'ABT dans l'eau. En effet, en absence de complexe de fer aucune disparition d'ABT n'est obtenue. Le mécanisme impliqué dans ce processus a été détaillé précédemment (**Figure V.46**) et fait intervenir les radicaux HO^\bullet et/ou $\text{CO}_3^{\bullet-}$. Les complexes de fer apparaissent donc comme de bons photoinducteurs pour la transformation de composés organiques comme cela a déjà été montré pour le 4-chlorophénol (Abida *et al.*, 2006).

Par contre, l'activation par le fer du métabolisme d'ABT et plus généralement d'un composé organique n'est pas un résultat connu chez les bactéries aérobies. La seule observation rapportée dans la littérature concernait une inhibition de la dégradation du toluène par des souches de *Pseudomonas* carencées en fer (Dinkla *et al.*, 2001).

Les différentes observations obtenues au cours de ce travail de thèse permettent de proposer un schéma d'interaction entre le fer et les bactéries (**Figure V.47**) :

Cellule

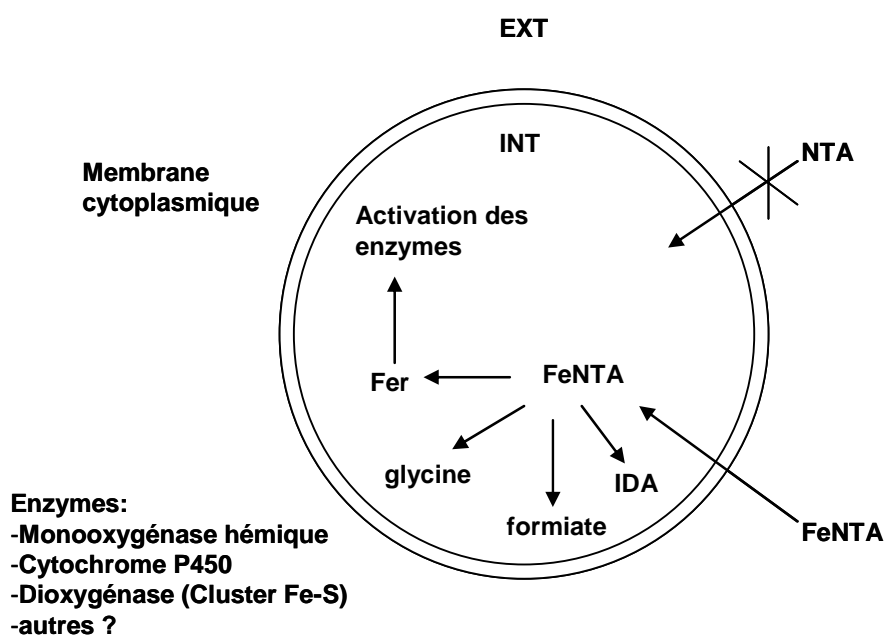


Figure V.47 : Implication du fer dans le métabolisme bactérien.

La première étape consiste à savoir sous quelle forme le fer entre dans la cellule (complexé avec le NTA ou non). En effet, la littérature ne nous permet pas de répondre à cette question car aucune donnée précise n'indique si le complexe de fer, FeNTA peut entrer dans la cellule sous cette forme ou si il y a une première étape de décomplexation suivie d'une entrée indépendante du fer et du ligand NTA (Egli, 2001). Pour trancher entre ces deux hypothèses, des expériences par RMN *in situ* pour suivre le devenir de NTA et du FeNTA en présence de cellules ont été réalisées. Il a été clairement mis en évidence que le NTA seul n'était pas métabolisé par les cellules et donc qu'il ne rentre pas dans celles-ci. Par contre, le FeNTA est dégradé en IDA, glycine et formiate par les cellules. Bien que le système de transport du FeNTA ne soit pas connu chez les bactéries, cela indique que le complexe de fer rentre dans la cellule. De plus, les dosages de fer réalisés dans les différents compartiments (milieux intra- et extra-cellulaires et adsorbé à la surface de la cellule) montrent qu'une partie du fer est effectivement retrouvée à l'intérieur des cellules. Cependant la spéciation du fer (état de valence II ou III) intra-cellulaire n'a pas été déterminée.

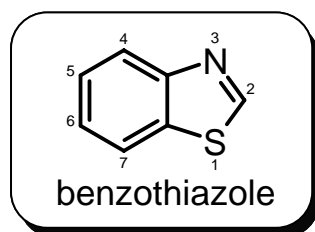
Le fer une fois dans la cellule pourrait activer les enzymes intervenant dans la dégradation de l'ABT. En particulier, il est connu que certaines dioxygénases contenant un cluster [2Fe-2S] possèdent également du Fe(II) directement complexé à la protéine. Dans certaines conditions, par exemple lors de leur purification, le Fe(II) s'oxyde en Fe(III) qui devient plus labile et donc l'enzyme perd de son activité. *In vitro*, sur l'enzyme purifiée si l'on ajoute du Fe(II) ou un agent réducteur l'activité de l'enzyme est rétablie (Wackett *et al.*, 1988 ; Candidus *et al.*, 1994 ; Schach *et al.*, 1995). On peut donc imaginer que dans notre système *in vivo*, le Fe(II) qui va activer les dioxygénases impliquées dans la dégradation d'ABT provient de l'oxydoréduction du complexe Fe(III)NTA par une NADH-FMN oxydoréductase (Egli, 2001). Cette hypothèse est également cohérente avec les résultats obtenus par Dinkla *et al.* (2001) qui ont montré que l'activité d'une monooxygénase et de deux dioxygénases augmentait avec l'addition de fer dans des cellules de *Pseudomonas putida* carencées en fer. Dans notre cas nous avons vérifié que nos cellules n'étaient pas carencées en fer. En effet, la culture des cellules dans un milieu riche en fer ne change pas l'efficacité de dégradation d'ABT par les cellules de *Rhodococcus*.

V.2 PHOTO- ET BIODEGRADATION DE BT EN MILIEU AQUEUX

Au vu des résultats très encourageants obtenus quant au rôle positif du fer sur la photo- et la biodégradation d'ABT et du 6OH-ABT, nous avons cherché dans cette deuxième partie de notre travail à tester le rôle du fer sur une molécule analogue, le benzothiazole. La même souche *Rhodococcus rhodochrous* OBT18 est capable de dégrader ce composé (Besse *et al.*, 2001). Ce composé est très largement retrouvé dans l'environnement aussi bien dans les eaux de surface que dans les stations d'épuration urbaines (Kloepfer *et al.*, 2004, 2005). Dans ce travail, nous avons mis particulièrement l'accent sur la spéciation du fer en testant à la fois des sels ferriques et le complexe FeNTA, ce qui donne une vision plus générale des possibilités offertes dans l'environnement pour l'interaction des espèces ferriques.

V.2.1 Caractéristiques physico-chimiques de BT

La structure chimique du benzothiazole (BT) est présentée ci-dessous :



Le BT se présente sous forme d'un liquide à température ambiante, ses principales caractéristiques physico-chimiques sont présentées dans le **Tableau V.9** :

Formule brute	C ₇ H ₅ NS
Masse molaire	135,19 g mol ⁻¹
Température de fusion	2°C
Température d'ébullition	227-228°C
Densité	1,238 g mL ⁻¹
Solubilité dans l'eau	4,3 g L ⁻¹ à 25° C

Tableau V.9 : Propriétés physico-chimiques de BT

Le spectre d'absorption UV-visible de ce composé à pH 7,0 dans l'eau est présenté **Figure V.48** :

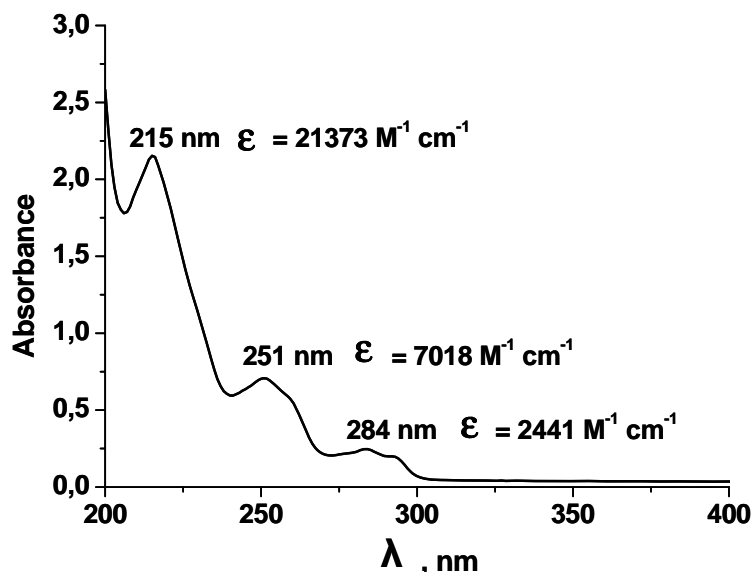


Figure V.48 : Spectre UV-visible de BT 0,1 mM dans l'eau, pH = 7,0.

On observe trois maxima d'absorption centrés à 215 ; 251 et 284 nm avec des coefficients d'absorption moléculaire de 21373 ; 7018 et 2441 M⁻¹ cm⁻¹ respectivement.

V.2.2 Photodégradation de BT en présence de sel ferrique

Les sels de fer III (Fe(ClO₄)₃, 9H₂O) ont été utilisés comme photoinducteurs très efficaces pour la dégradation de polluants dans le compartiment aquatique (Mestankova *et al.*, 2004 et les références citées). Ce sel de Fe(III) a été également choisi à cause de son anion perchlorate qui est non-oxydant et inactif photochimiquement.

La photodégradation induite de BT en présence d'espèces Fe(III) a été effectuée dans le même photo-bioréacteur que celui utilisé pour ABT (voir partie Matériel et Méthodes). C'est le même incubateur qui a été utilisé pour l'étude d'ABT. Le BT est stable en solution aqueuse, il n'a pas été observé de dégradation en absence de lumière à 27°C. De plus, le BT n'absorbe pas à des longueurs d'onde supérieures à 300 nm ; donc aucune dégradation par photolyse directe n'a été observée pendant l'irradiation de BT en incubateur.

La dégradation de BT est suivie par analyse HPLC phase inverse, des différents prélèvements, avec un détecteur UV-visible.

Les premières expériences sous irradiation ont été effectuées avec $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ à deux concentrations différentes (0,3 et 3,0 mM) et à deux pH différents : pH=3,2, proche du pH naturel de la solution ferrique à ces concentrations et pH=7,5, pH plus compatible avec l'activité des microorganismes. Les pourcentages de disparition de BT après 120h d'irradiation sont présentés dans le **Tableau V.10**.

[Fe(III) aquacomplexes]	Pourcentage de dégradation de BT	
	pH = 3,2	pH = 7,5
0,3 mM sans hv	10	10
0,3 mM avec hv	77	32
3,0 mM avec hv	100	42

Table V.10 : Pourcentages de disparition du BT (1,0 mM) après 120 h d'irradiation en présence de sels ferriques à différentes concentrations.

A pH=3,2 (**Figure V.49A**), la photodégradation de BT est importante en présence de $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_3$ à pH 3,2: 77 et 100% de BT ont disparu après 120 h et 40 h d'irradiation pour une concentration initiale de sel de Fe(III) de 0,3 et 3,0 mM respectivement. La disparition de BT en présence de lumière est plus importante à pH 3,2 puisqu'à pH 7,5 elle est de 32 et 42% pour des concentrations de 0,3 et 3,0 mM respectivement (**Figure V.49B**).

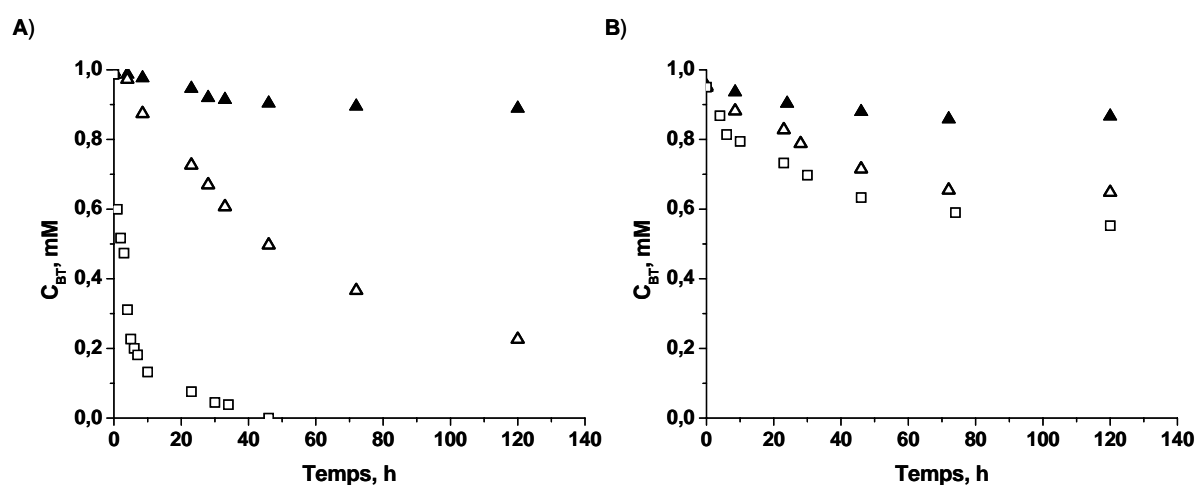


Figure V.49 : Effet de sels de Fe(III) sur la photodégradation de BT (1,0 mM). Influence du pH et de la concentration de Fe(III). **A)** pH 3,2, **B)** pH 7,5, (▲) 0,3 mM Fe(III) sans lumière; (△) 0,3 mM Fe(III) avec lumière; (□) 3,0 mM Fe(III) avec lumière.

Ce résultat peut être expliqué par la spéciation des complexes aqueux de Fe(III) en fonction du pH et par la concentration initiale en Fe(III) (Knight et Sylva, 1974 ; Faust et Hoigné, 1990). Comme il est reporté dans la littérature, la spéciation du Fe(III) joue un rôle important dans la photoréactivité des complexes aqueux du Fe(III). A pH=3,2, les espèces de Fe(III) en solution sont principalement sous forme de monomère de $\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_5(\text{OH})^{2+}$ (ou par

simplification $\text{Fe}(\text{OH})^{2+}$). Cette espèce est la plus réactive photochimiquement en terme de production de radical $\cdot\text{OH}$ (radical fortement oxydant) et par conséquent la plus réactive pour la dégradation des polluants présents en solution (Poulain *et al.*, 2003). Par contre, à $\text{pH}=7,5$, il y a précipitation de $\text{Fe}(\text{OH})_3$ amorphe et le rendement quantique en radicaux $\cdot\text{OH}$ produits à partir de $\text{Fe}(\text{OH})_3$ est de deux ordres de grandeur plus faible que celui de $\text{Fe}(\text{OH})^{2+}$. De plus, à ce pH , la concentration en fer dissous est très faible (inférieure au μM), la grande majorité est sous forme d'oxyhydroxydes ou d'oxydes de fer. Dans l'expérience effectuée à $\text{pH}=7,5$, le pourcentage de dégradation de BT est très proche (32 et 42%) pour les deux concentrations de sel de $\text{Fe}(\text{III})$ (0,3 et 3,0 mM). Ce résultat confirme la faible disponibilité du fer quand le pH de la solution est supérieur à 6,0-7,0 et également la faible photoréactivité des oxyhydroxydes de fer.

A $\text{pH}=3,2$, la dégradation de BT est d'autant plus rapide que la concentration en $\text{Fe}(\text{III})$ est plus élevée. Ce résultat montre clairement que les espèces de $\text{Fe}(\text{III})$ présentes à ce pH ($\text{Fe}(\text{OH})^{2+}$) ont un effet photoinducteur important et sont responsables de la disparition de BT. En absence de lumière, seulement 10% de BT a disparu après 120 h. Ce faible taux de disparition peut être expliqué par un processus classique de floculation en présence de sels de $\text{Fe}(\text{III})$, processus utilisé depuis de nombreuses années dans les stations de traitement de l'eau. De plus, nous avons vérifié que dans nos conditions expérimentales, il n'y a pas de complexation entre le BT et le $\text{Fe}(\text{III})$.

Contrairement aux résultats observés avec les complexes aqueux de $\text{Fe}(\text{III})$ où la disparition de BT est plus faible à $\text{pH } 7,5$ qu'à $\text{pH } 3,2$, Abida *et al.*, (2006) ont montré que la photoréactivité du FeNTA pour la dégradation de polluants n'est pas dépendante du pH . Une deuxième série d'expériences d'irradiation a donc été effectuée en présence du complexe FeNTA (0,3 et 3,0 mM) à $\text{pH} = 7,5$ (pH plus compatible pour les microorganismes et l'environnement). Les pourcentages de disparition de BT après 120 h d'irradiation sont présentés dans le **Tableau V.11**.

Pourcentages de dégradation de BT	
[FeNTA]	$\text{pH} = 7,5$
3,0 mM sans $h\nu$	7
0,3 mM avec $h\nu$	44
3,0 mM avec $h\nu$	94

Tableau V.11 : Pourcentages de disparition du BT (1,0 mM) après 120h d'irradiation en présence de FeNTA à différentes concentrations.

Comme dans le cas des complexes aqueux de Fe(III), le complexe FeNTA est capable de photoinduire la dégradation de BT. Cependant le pourcentage de dégradation à pH = 7,5 est beaucoup plus important avec FeNTA par rapport aux complexes aqueux de fer pour les mêmes concentrations en fer: 44 et 94% avec FeNTA (0,3 et 3,0 mM) en comparaison avec 32 et 42% avec les complexes aqueux de Fe(III) (0,3 et 3,0 mM). Le même effet de concentration avec FeNTA a été observé sur la disparition de BT : plus la concentration est élevée, plus la dégradation de BT est rapide. Ce résultat confirme que le complexe FeNTA a un effet photoinducteur sur la dégradation de BT. Cependant, l'efficacité de la dégradation de BT est plus faible en présence du complexe FeNTA: à pH 7,5 94% de BT a disparu après 120 h d'irradiation alors que nous avons obtenu en présence de complexes aqueux de Fe(III), à pH 3,2 100% de disparition de BT après 40 h d'irradiation.

Lors de l'irradiation du mélange complexe de Fe(III) (aqueux ou avec NTA) avec le BT, un grand nombre de photoproduits sont formés, en particulier avec les concentrations élevées en sels de Fe(III), mais en très faible quantité et aucune accumulation de produits intermédiaires n'est observée. Le 2-hydroxybenzothiazole (OBT) et le 2,6-dihydroxybenzothiazole (diOBT), qui sont les métabolites principaux identifiés lors de l'incubation avec *Rhodococcus rhodochrous* (Besse *et al.*, 2001) (**Figure V.50**), n'ont pas été détectés dans les processus de photodégradation.

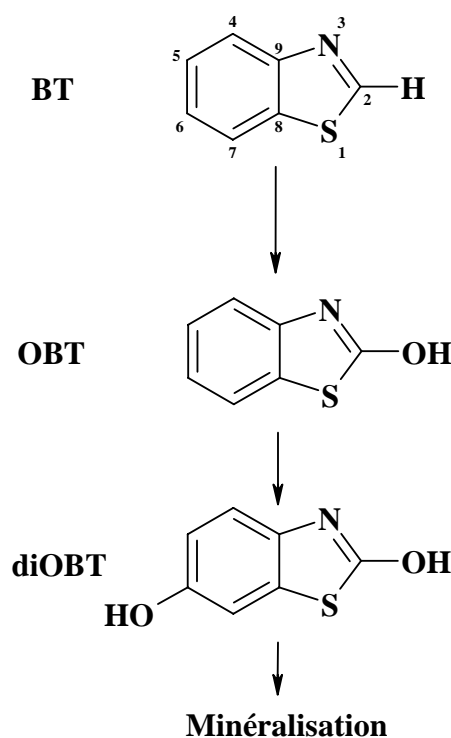


Figure V.50 : Voie de biodégradation de BT par *Rhodococcus rhodochrous*.

Les spectres UV-Visible de ces composés sont présentés dans la **Figure V.51** :

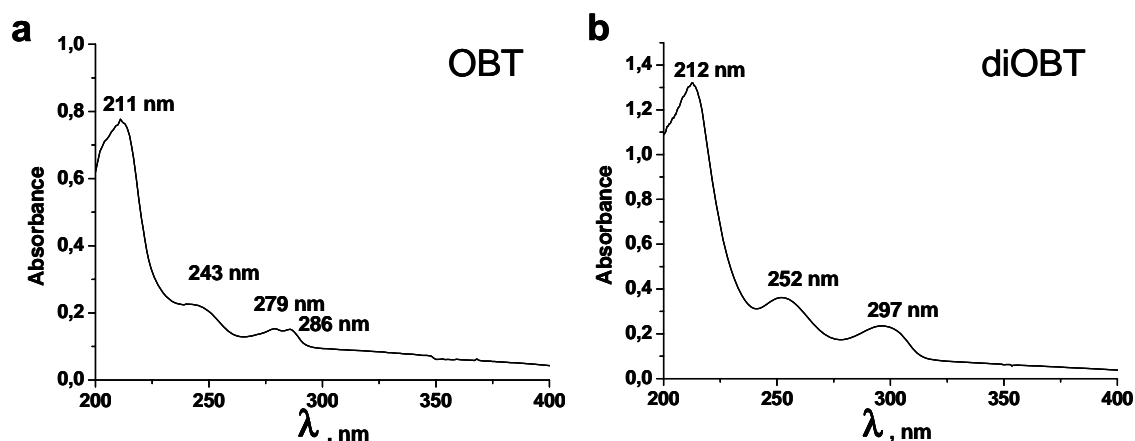


Figure V.51 : Spectres UV-Visible des métabolites de BT : a) 2-hydroxybenzothiazole (OBT) ; b) 2,6-dihydroxybenzothiazole (diOBT).

La perte de masse importante observée entre le BT dégradé et les photoproduits détectés peut être attribuée à un clivage rapide du cycle aromatique, qui conduit à la formation de photoproduits non détectés par notre système HPLC avec détecteur UV-visible. Une autre explication pour la perte de masse importante observée est la photolyse des photoproduits primaires. En effet, nous avons montré que 60% d'OBT (1,0 mM) disparaît après 120 h d'irradiation d'une solution aqueuse d'OBT pure (résultats non présentés).

V.2.3 Biodégradation de BT en présence de sels de fer (III)

V.2.3.1 Effet de la concentration des sels ferriques

Les expériences de biodégradation ont été effectuées en conditions aérobies dans le même incubateur que celui décrit précédemment mais en absence de lumière.

Des cellules de *Rhodococcus rhodochrous* au repos métabolique ont été incubées en présence de 1,0 mM de BT avec ou sans $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ ou FeNTA à pH neutre. Les cinétiques de biodégradation ont été contrôlées par HPLC en conditions isocratiques. Dans tous les cas, deux métabolites ont été détectés : le 2-hydroxybenzothiazole (OBT, temps de rétention 15,0 min), qui est formé presque quantitativement et le 2,6-dihydroxybenzothiazole (diOBT, temps de rétention 5,5 min) (**Figure V.50**). Ces métabolites ont été identifiés et caractérisés précédemment par spectrométrie de masse et RMN (Besse *et al.*, 2001). La présence de $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (3,0 mM) a un effet positif sur la dégradation de OBT et diOBT (**Figure V.52A-C**).

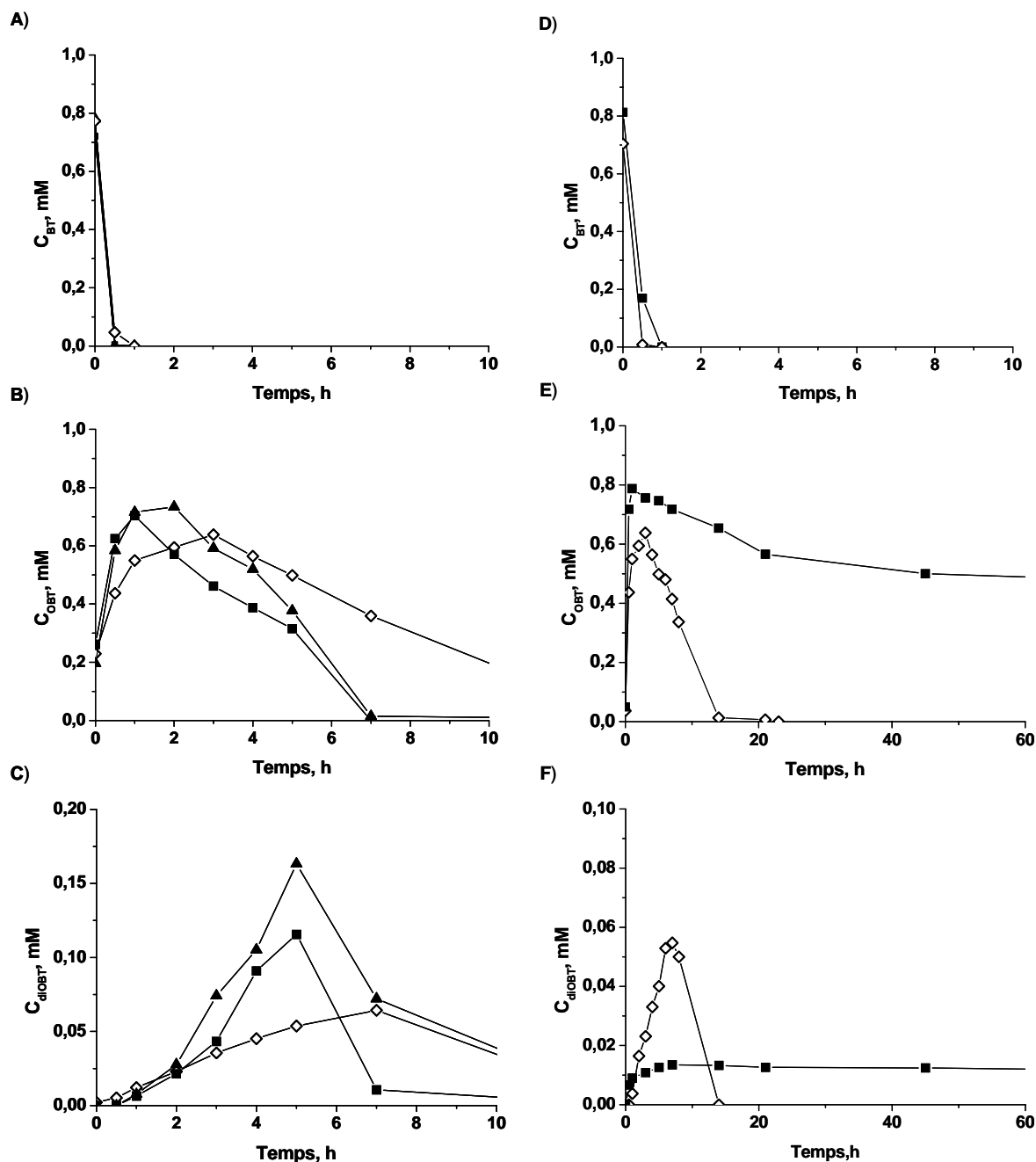


Figure V.52 : Effet de la concentration en Fe(III) sur la biodégradation de BT (1,0 mM) par *Rhodococcus rhodochrous*. Cinétiques d'évolution des concentrations de : A) BT, B) OBT et C) diOBT. (\diamond) sans sel de Fe(III), (\blacktriangle) avec sels des Fe(III) 0,3 mM, (\blacksquare) avec sels des Fe(III) 3,0 mM. Cinétiques d'évolution des concentrations de : D) BT, E) OBT et F) diOBT. (\diamond) sans FeNTA, (\blacksquare) avec 3,0 mM FeNTA.

Cet effet n'a pas pu être mis en évidence dans la cinétique de disparition de BT car sa transformation est très rapide (moins de 30 min) et le nombre de prélèvements n'était pas suffisant pendant cette période. Par contre, la formation et la dégradation des deux métabolites (OBT et diOBT) ont été clairement accélérées en présence de sels de fer. Cet effet d'accélération est plus important quand la concentration en $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ est plus élevée.

Puisque la concentration en fer soluble est relativement faible dans ces deux conditions, ce résultat suggère que les microorganismes sont capables d'utiliser les particules d'hydroxyde de fer qui sont plus abondantes à 3,0 mM qu'à 0,3 mM.

Par contre en présence de FeNTA (3,0 mM), au contraire des complexes aqueux de fer, un effet inhibiteur important est observé. Bien que le cinétique de disparition de BT n'ait pas été affectée par la présence de FeNTA (cinétique très rapide), sa transformation en OBT a été fortement inhibée (**Figure V.52D-F**). Après 120 h d'incubation, la concentration en OBT est encore égale à 0,5 mM, alors qu'en présence de $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_3$ (0,3 ou 3,0 mM) et même sans fer, OBT est complètement dégradé après 7 h et 14 h d'incubation, respectivement. Le même effet est observé pour la dégradation de diOBT qui est encore présent en solution après 120 h d'incubation en présence de FeNTA. Ces résultats montrent l'importance de la spéciation du fer dans les mécanismes de biodégradation et donc pour son utilisation par les microorganismes.

Avec $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_3$, on observe une augmentation du taux de biodégradation du benzothiazole alors qu'en présence du complexe FeNTA, la dégradation d'OBT et de diOBT est fortement inhibée.

V.2.3.2 Effet du pH

Comme les sels de Fe(III) sont plus solubles à un pH acide, nous avons testé l'influence du pH sur la biodégradation de BT. Il faut cependant respecter la physiologie microbienne qui nécessite des pH proches de la neutralité. Deux pH ont ainsi été choisis 7,5 («pH normal») et 6,2. Le métabolisme de BT par *R. rhodochrous* est tout à fait identique aux deux pH en absence de sels de fer (**Figure V.53**). Par contre, les cinétiques de formation et de dégradation d'OBT et diOBT ont été accélérées à pH 6,2 par rapport à pH 7,5 en présence de 3,0 mM $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$. Ce résultat peut être expliqué par une meilleure solubilité du Fe(III) à un pH plus acide et/ou par la spéciation des complexes aqueux de Fe(III) en fonction du pH. Une autre hypothèse pour expliquer le rôle du pH sur la biodégradation en présence de sels du Fe(III) pourrait être liée aux mécanismes impliqués dans les interactions fer/bactéries (transport, oxydoréductases, etc...).

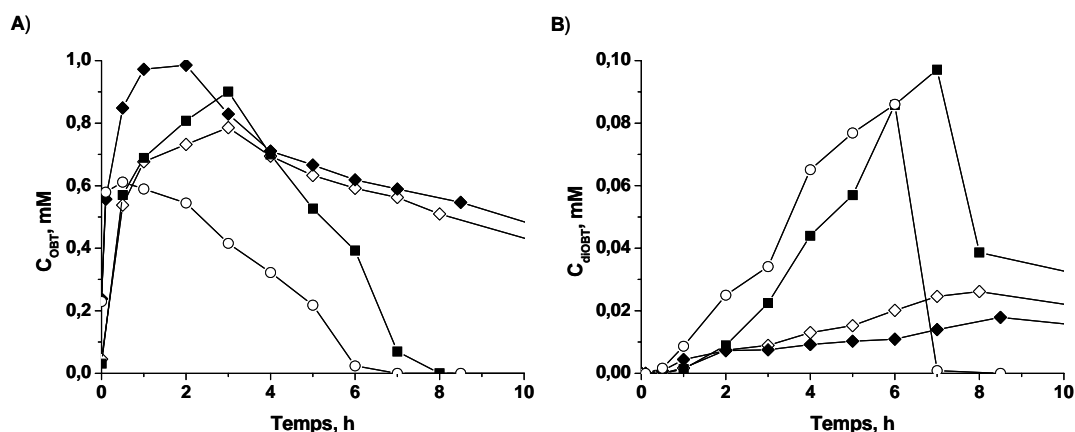


Figure V.53 : Effet du pH sur la biodégradation de BT (1,0 mM) par *Rhodococcus rhodochrous*. Cinétiques d'évolution des concentrations de : **A)** OBT et **B)** diOBT. (◇) pH = 7,5 sans sel de Fe(III), (◆) pH = 6,2 sans sel de Fe(III), (■) pH = 7,5 avec sel de Fe(III) 3,0 mM, (○) pH = 6,2 avec sel de Fe(III) 3,0 mM.

V.2.4 Biodégradation de BT en présence du ligand NTA

L'extraction éventuelle du fer du complexe FeNTA pourrait conduire à la libération du ligand (NTA) en solution. L'effet de NTA (1,0 mM) sur le milieu de biodégradation de BT a donc été testé (**Figure V.54**).

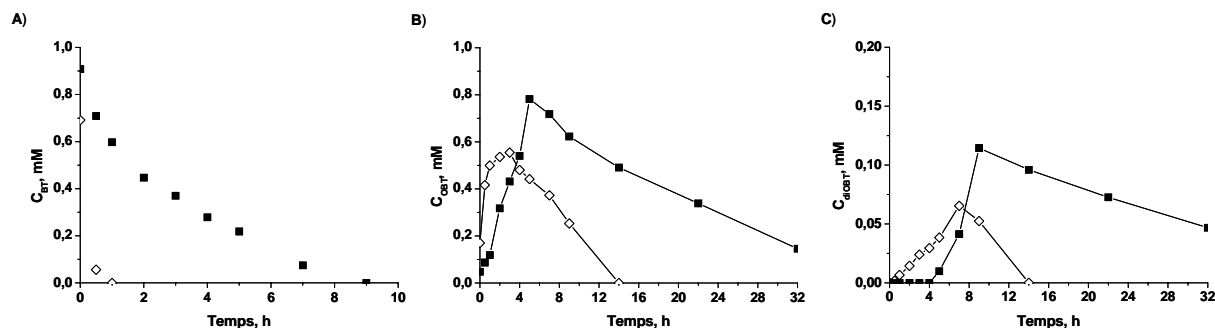


Figure V.54 : Effet de NTA (1,0 mM) sur la biodégradation de BT (1,0 mM) par *Rhodococcus rhodochrous*. Cinétiques d'évolution des concentrations de: **A)** BT, **B)** OBT et **C)** diOBT sans (◇) ou avec (■) NTA.

La biotransformation de BT en OBT est fortement ralentie en présence de NTA, puisque le BT disparaît complètement après 9 h d'incubation au lieu de 1 h en absence de NTA. Ce ralentissement affecte aussi la biodégradation d'OBT et diOBT, les deux métabolites principaux de la biodégradation de BT. Le NTA a donc un effet inhibiteur important sur la biodégradation de BT.

V.2.5 Discussion

Les résultats ont montré que BT ne subit pas de photolyse directe dans notre incubateur. Dans cette discussion nous considérerons cinq systèmes de dégradation de BT (1,0 mM) à un pH égal à 7,5 :

- 1) Photochimique I ($\text{Fe}(\text{ClO}_4)_3$ (3,0 mM) + lumière)
- 2) Photochimique II (FeNTA (3,0 mM) + lumière)
- 3) Microbiologique (*Rhodococcus rhodochrous* OBT18)
- 4) Combiné I (*Rhodococcus rhodochrous* OBT18 + $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_3$ (3,0 mM))
- 5) Combiné II (*Rhodococcus rhodochrous* OBT18 + FeNTA (3,0 mM))

V.2.5.1 Evaluation de l'efficacité des systèmes

L'efficacité de transformation de BT par ces cinq systèmes est présentée dans le **Tableau V.12** :

	Photochim I	Photochim II	Microbiologique	Combiné I	Combiné II
% de BT dégradé	42% après 120h	94% après 120h	100% après 30min	100% après 30 min	100% après 30 min
Concentration OBT (mM) après 8h	Non détecté	Non détecté	0,39	0	0,72

Tableau V.12 : Pourcentages de transformation de BT et concentration d'OBT obtenus dans les cinq systèmes.

Photochimiquement, on s'aperçoit qu'à pH neutre l'utilisation du complexe FeNTA est plus efficace car le fer reste soluble quand il est sous cette forme. Avec les sels ferriques, la grande majorité du fer est précipitée (concentration en fer soluble inférieure au μM). Cependant au bout de 120h, 42% du BT est transformé ce qui prouve une activité photochimique non négligeable à la surface des particules de fer. Aucun photoproduit ne s'accumule dans ces conditions.

La transformation de BT par les microorganismes est extrêmement rapide ce qui ne permet pas d'apprécier l'effet du fer quelle que soit sa forme. Par contre au niveau de la transformation d'OBT ou de diOBT, métabolites principaux, l'effet de l'ajout de fer est évident mais opposé selon la forme de l'espèce ferrique ajoutée. Alors que les sels ferriques (majoritairement sous forme de particules) activent la transformation d'OBT (tout l'OBT est transformé après 7h d'expérience), les complexes FeNTA inhibent fortement la disparition d'OBT. OBT et diOBT s'accumulent dans le milieu d'incubation.

V.2.5.2 Comparaison des voies de dégradation photochimique et microbiologique

La **Figure V.55** schématise les voies de transformation de BT dans les différents systèmes.

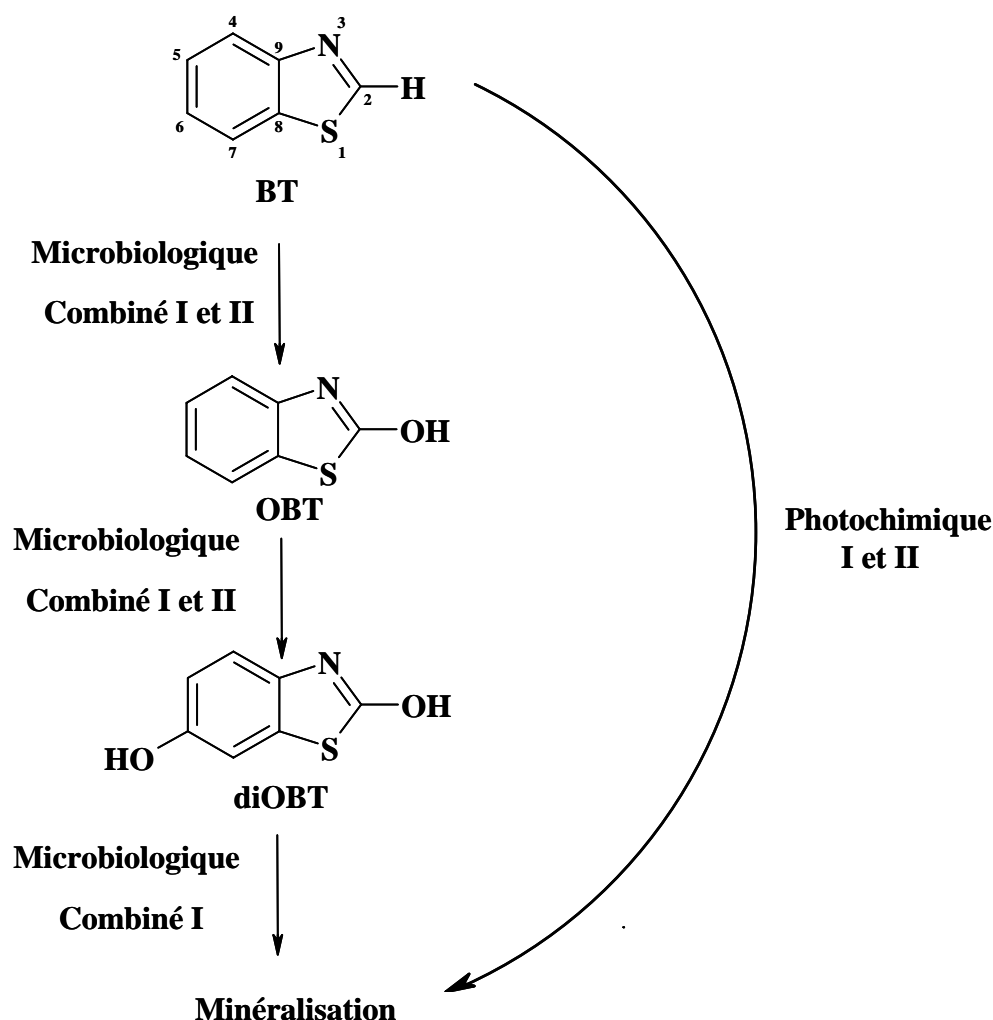
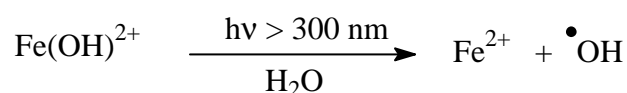


Figure V.55 : Voies de dégradation de BT par les processus simples et combinés.

La dégradation par la voie photochimique I est très certainement due à l'attaque par les radicaux HO^\bullet . On sait depuis longtemps que les complexes aqueux de Fe(III) sont une source importante de radicaux HO^\bullet sous irradiation solaire *via* un processus de photooxydoréduction intramoléculaire entre le fer et H_2O ou le ligand OH^- .



Dans le cas du système photochimique II, le mécanisme de photooxydoréduction de FeNTA a été décrit en détail dans le chapitre consacré à ABT.

Dans ces deux systèmes aucun photoproduit intermédiaire n'a été détecté. L'ouverture du noyau aromatique doit être très rapide, empêchant la détection d'intermédiaires avec le système d'analyse utilisé.

Les systèmes combinés I et II ne modifient pas le schéma métabolique de transformation de BT établi pour les microorganismes seuls (Besse *et al.*, 2001). Cependant, dans le système combiné II (avec FeNTA), les intermédiaires métaboliques OBT et diOBT s'accumulent en solution. La minéralisation totale (mesurée par TOC, résultat non montré) observée lors du processus microbiologique n'a plus lieu dans le système combiné II.

V.2.5.3 Rôle du fer

Le rôle du fer dans les processus de photodégradation est maintenant bien établi. Une interaction du fer dans les processus de biodégradation de BT par *R. rhodochrous* a également été observée : une augmentation de la vitesse de transformation de BT en présence de sels ferriques et une inhibition en présence de FeNTA.

Dans le cas des sels ferriques, ces résultats montrent le rôle potentiellement positif d'un apport de fer augmentant la capacité de biodégradation des bactéries. Ces expériences montrent que le fer peut rentrer dans la cellule, pour stimuler les enzymes de dégradation, sans être complexé sous forme de FeNTA. Dans la souche de *Rhodococcus* utilisée, la première étape pourrait être l'extraction du fer par cette bactérie. Le transport du fer dans la cellule pourrait se produire suivant deux voies principales : soit le Fe^{3+} est d'abord réduit en Fe^{2+} par une réductase à flavine extra-cellulaire ou intégrée dans la membrane, puis Fe^{2+} est transporté *via* un transporteur membranaire spécifique ; soit Fe^{3+} est chélaté par un sidérophore qui est ensuite intégré à l'intérieur de la cellule où il est réduit (Pierre *et al.*, 2002). Le transport du fer dans le genre *Rhodococcus* est encore inconnu ; toutefois Carrano *et al.*, (2001) ont mis en évidence chez *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 le premier sidérophore caractérisé, nommé hétérobactine. Bien qu'ils ne soient pas identifiés, la présence de sidérophores a aussi été montrée chez d'autres rhodocoques en particulier *Rhodococcus rhodochrous* (Fiss et Brooks, 1991).

Comme il a été suggéré précédemment, la présence de fer peut augmenter l'activité de mono- et dioxygénases qui sont susceptibles d'être impliquées dans cette voie métabolique. Il a été montré que l'activité d'une catéchol 1,2-dioxygénase dans la voie de dégradation de BT par *Rhodococcus pyridinovorans* PA produit les mêmes intermédiaires métaboliques (OBT et

diOBT) (Haroune *et al.*, 2002). Quelques publications rapportent l'activation *in vitro* de dioxygénases purifiées par l'addition des ions ferriques, par exemple l'activation de la toluène dioxygénase chez *Pseudomonas putida* (Wackett *et al.*, 1988) et de la catéchol 1,2-dioxygénase chez *Rhodococcus rhodochrous* CTM (Candidus *et al.*, 1994). Il est très intéressant également de noter, que le Fe^{2+} peut réguler l'expression des gènes impliqués dans la virulence de *Rhodococcus equi* en modulant la fixation des répresseurs de la transcription (Meijer et Prescott, 2004). On ne peut donc pas exclure que le fer pourrait aussi réguler l'expression d'autres gènes chez *Rhodococcus*.

Avec FeNTA, on observe une inhibition de la biodégradation de BT, et en particulier de la biotransformation des métabolites obtenus. Ce résultat est surprenant car il est opposé à ce que nous avons observé pour la dégradation d'ABT. Pour comprendre cet effet négatif, il est important de comparer les conditions utilisées dans le cas de BT avec celles d'ABT. Deux différences majeures existent:

(i) Dans le schéma métabolique de transformation de BT, il existe une étape enzymatique supplémentaire (E_1) qui conduit à OBT (hydroxylation du noyau thiazole, position déjà substituée dans le cas d'ABT par NH_2) (*Figure V.56*).

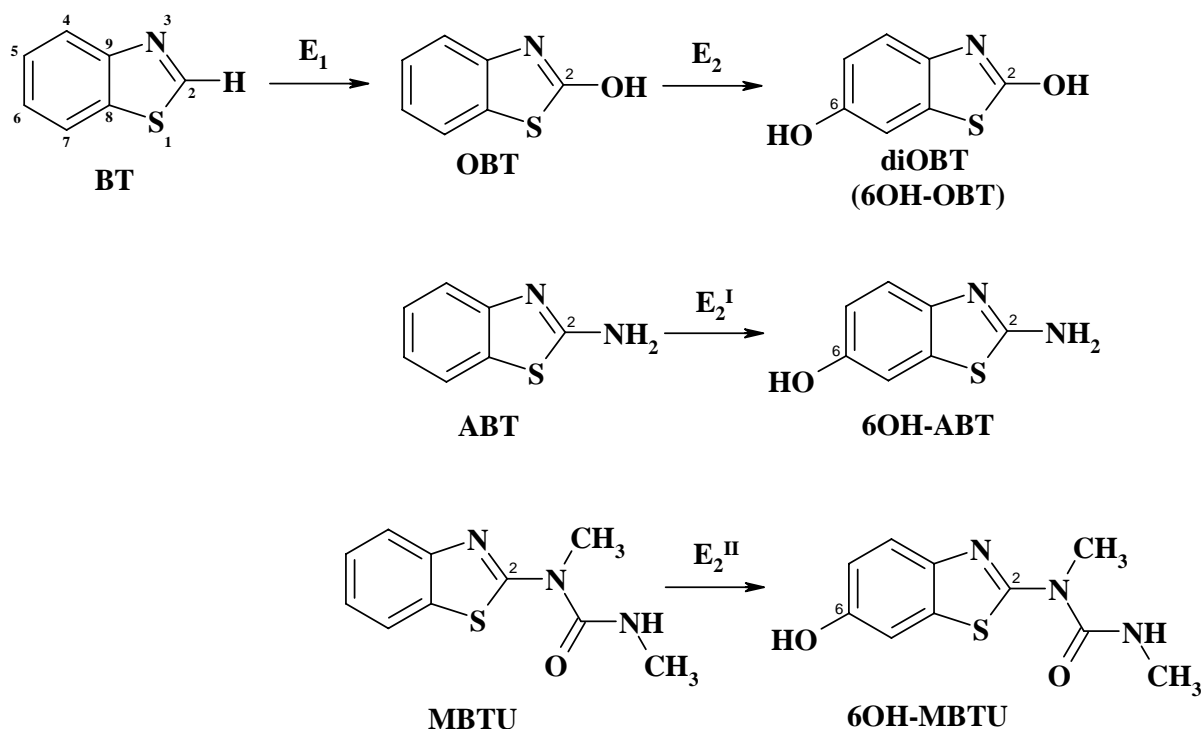


Figure V.56: Etapes enzymatiques de la transformation de BT, ABT et MBTU.

On pourrait penser *a priori* que le FeNTA a un effet négatif sur cette enzyme E_1 alors qu'il active l'enzyme suivante E_2 . Cette hypothèse est confortée par le fait que la dégradation

du MBTU, qui ne comprend qu'une étape enzymatique pour aboutir au dérivé 6OH, est activée par le FeNTA comme dans le cas d'ABT (résultat non publié). Cependant, d'après nos cinétiques, l'étape E1 n'est pas du tout affectée par la présence de FeNTA puisque l'on observe une transformation quasi quantitative de BT en OBT. Un effet négatif direct de FeNTA sur cette première enzyme E1, présente uniquement dans le cas de BT, ne semble donc pas être une hypothèse convaincante.

(ii) La deuxième différence est que nous n'avons pas du tout les mêmes rapports de concentrations cellulaires et de complexes de fer pour BT et ABT (et également MBTU). Le rapport des concentrations $[FeNTA]/[cellules]$ est 50 fois plus important dans le cas de BT. Cette différence peut expliquer le ralentissement du métabolisme microbien par un effet toxique de FeNTA.

A ce stade de la discussion, il est important de noter que dans les expériences avec BT le pH de départ a été fixé à 7,5 alors qu'il est égal à 7,0 dans les cas d'ABT et du MBTU. Nous savons que le complexe de FeNTA se décomplexe lentement à partir de $pH > 7,0$ (Andrianirinarivelo *et al.*, 1993, Abida, 2005). Ce phénomène libérerait beaucoup plus de NTA en solution aqueuse, d'une part parce qu'il est plus concentré et que le pH est plus élevé dans le cas de BT. Le NTA est un chélateur capable de complexer différents cations divalents ou trivalents. Il pourrait ainsi interférer avec des ions indispensables à la cellule ou des ions impliqués dans la transformation enzymatique de BT en OBT et diOBT. Cette dernière hypothèse a été testée et une diminution de la biodégradation de BT a été observée en présence de NTA. Cet effet inhibiteur du ligand a été également observé pendant la biodégradation du benzoate de sodium par des communautés microbiennes en présence de l'acide diéthylènetriaminepentaacétique (DTPA) (Metsärinne *et al.*, 2004).

Cependant, nous ne pouvons pas exclure la toxicité induite par une forte concentration en FeNTA ou en fer à l'intérieur de la cellule.

VI

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

VI.1 CONCLUSIONS

La dégradation de deux dérivés du benzothiazole par des processus photochimique, microbiologique et combinant les deux aspects a été étudiée au cours de ce travail. Les résultats obtenus ont permis des avancées significatives dans les domaines de connaissance suivants :

1) En ce qui concerne **les voies de dégradation**, des éléments nouveaux ont été apportés, aussi bien pour les benzothiazoles que pour le complexe de fer étudiés.

Au niveau biologique, pour la dégradation d'ABT, la structure de deux nouveaux métabolites a été proposée (4OH-ABT et un dérivé catéchol) en plus de celle du 6OH-ABT déjà connue. Au niveau photochimique, aucune étude de dégradation que ce soit pour BT ou ABT n'avait été réalisée. Le fait le plus marquant est que l'on retrouve les mêmes intermédiaires pour la dégradation d'ABT par voie photochimique que par voie microbiologique.

Une très grande similarité existe aussi entre les voies de dégradation du FeNTA par les microorganismes et par la lumière. Les mêmes intermédiaires sont formés: formiate, glycine, IDA. Par contre les microorganismes continuent la dégradation de l'IDA, de la glycine et du formiate. Il faut noter également que jusque là les bactéries décrites comme capables de dégrader FeNTA étaient Gram négatives, nous montrons ici la même faculté pour des bactéries Gram positives du genre *Rhodococcus* (Egli, 2001). Enfin nos expériences montrent que chez notre souche microbienne, le complexe FeNTA est transporté dans la cellule et non le ligand seul, ce résultat est intéressant car peu de données existent dans la littérature au sujet du transport de ces molécules.

2) En terme **d'efficacité de dégradation**, nos études montrent que les systèmes combinés [microorganismes + fer \pm lumière] sont en général beaucoup plus efficaces que les systèmes simples [microorganismes seuls ou fer + lumière]. Ceci est d'autant plus marquant que le composé de départ est peu dégradable. En effet l'ABT est peu transformé par la souche de *R. rhodochrous* et de plus, sa dégradation s'arrête au niveau du premier intermédiaire métabolique (6OH-ABT). La présence de FeNTA dans le milieu d'incubation avec les bactéries accélère fortement les réactions et permet d'aller beaucoup plus loin dans la chaîne métabolique. La combinaison [microorganismes + fer + lumière] est encore un peu plus efficace même si le fait marquant est d'abord l'activation des réactions enzymatiques par le

fer. Pour la dégradation de BT, qui est déjà facilement minéralisable par la souche de *R. rhodochrous*, l'apport de fer sous forme de sels ferriques s'est avéré très positif alors qu'une inhibition est observée quand le fer est ajouté sous forme de complexe FeNTA. Ce dernier résultat montre, et nous y reviendrons dans le paragraphe suivant, que le rôle du fer peut être modulé selon les conditions expérimentales telles que le pH, la concentration et la spéciation du fer, la concentration en bactéries ...etc. Concernant BT, c'est peut-être une des raisons qui fait que ce composé est retrouvé très largement dans les milieux aquatiques (naturels ou urbains) alors que l'on sait qu'il est facile à dégrader par des souches pures. En milieu complexe, contenant notamment du fer, ce composé devient peut-être moins facilement dégradé.

3) Enfin l'information la plus intéressante qui ressort de nos travaux, est peut-être la mise en évidence **du rôle majeur joué par le fer** dans nos systèmes, que ce soit en photodégradation ou en biodégradation.

Les propriétés photoinductrices du fer sont bien connues. Nous voyons ici une application extrêmement intéressante de ses propriétés pour la transformation des benzothiazoles (BT et ABT), composés qui n'absorbent pas directement la lumière solaire, et qui donc en l'absence de fer ne se dégradent pas dans l'environnement. Cependant la spéciation du fer est un élément capital dans l'efficacité du processus, celle-ci est notamment modulée par le pH du milieu aquatique. A travers cette étude, nous avons mis en évidence un phénomène important pour le devenir des composés organiques dans les compartiments aquatiques naturels. En effet, la complexation du fer par un acide aminopolycarboxylique comme le NTA conduit à une forme du fer qui reste active photochimiquement dans une large gamme de pH (de 3,0 à 7,0). De plus, ce complexe de fer (FeNTA) est souvent utilisé comme un bon modèle des complexes de fer présent dans la matière organique naturelle.

Le rôle du fer dans la modulation des mécanismes de biodégradation est un aspect qui a été peu étudié. Les résultats obtenus montrent que le fer est transporté dans la cellule soit *via* un système propre à la bactérie, soit sous forme de complexe FeNTA. Une fois à l'intérieur de la cellule, notre hypothèse est que le fer agit directement sur certaines enzymes impliquées dans la dégradation des benzothiazoles. Par exemple du Fe(II) pourrait activer des dioxygénases contenant un cluster [2Fe-2S] ou un Fe(II) lié directement à la protéine. En effet, il est connu que ce type d'enzyme peut facilement perdre son activité lorsque son Fe(II) est oxydé en Fe(III) et donc le Fe(II) issu de l'oxydoréduction enzymatique du complexe

FeNTA pourrait combler cette lacune. Cependant là encore, l'efficacité de ce processus dépend fortement de la spéciation du fer et des conditions environnementales.

En conclusion si l'on s'intéresse à des applications environnementales, nous avons montré que les systèmes combinés peuvent être extrêmement efficaces mais qu'ils sont aussi dépendants des conditions physico-chimiques du milieu, que ce soit dans les eaux de surface ou dans les stations d'épuration.

VI.2 PERSPECTIVES

Suite aux résultats encourageants obtenus au cours de cette thèse, de nombreuses perspectives sont à envisager :

- Dans un premier temps il va falloir analyser plus en détail quels sont les facteurs environnementaux qui régulent l'impact du fer sur le métabolisme microbien (concentrations relatives, pH, température, force ionique, ...).

- Afin de mieux comprendre l'effet des différents paramètres du milieu sur l'activité des cellules, des expériences de RMN ^{31}P *in vivo* sont à envisager. Pour identifier les espèces radicalaires mises en jeu au cours de ces processus de photo- et/ou de biodégradation, des expériences de RPE devront être réalisées.

- L'utilisation d'autres types de complexes de fer est également une priorité pour continuer sur ce thème de recherche. Nous envisageons de travailler avec un acide polycarboxylique de fer comme l'acide citrique, qui est naturellement présent dans l'environnement. De plus, afin de se rapprocher des conditions naturelles, une étude avec de la matière organique naturelle chargée en fer pourrait être mise en place. En effet, dans ces structures complexes et variées, il est important de savoir si les microorganismes sont capables d'extraire le fer complexé.

A plus long terme, il serait intéressant de proposer des expériences avec d'autres microorganismes afin de savoir si l'effet positif du fer peut être généralisé à différents systèmes. Par exemple, nous pourrions démarrer une nouvelle étude sur un système polluant-microorganismes dont les voies de dégradation sont connues et qui impliquent *a priori* des enzymes contenant du fer.

VII

RÉFÉRENCES

- Abida O., Mailhot G., Litter M. and Bolte M.,** Impact of iron-complex (Fe(III)-NTA) on photoinduced degradation of 4-chlorophenol in aqueous solution. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2006, 5, 395-402.
- Abida O.,** Thèse de l'Université Blaise Pascal, N° d'ordre D.U : 1635, Clermont Ferrand (France), 2005.
- Adams A.K. and Warshaw E.M.,** Allergic contact dermatitis from mercapto compounds. *Dermatitis*, 2006, 17, 56-70.
- Andreozzi R. and Marotta R.,** Removal of benzoic acid in aqueous solution by Fe(III) homogeneous photocatalysis. *Wat. Res.*, 2004, 38, 1225-1236.
- Andreozzi R., Caprio V. and Marotta R.,** Oxidation of benzothiazole, 2-mercaptobenzothiazole and 2-hydroxybenzothiazole in aqueous solution by means of H₂O₂/UV or photoassisted Fenton systems. *J. Chem. Biotechnol.*, 2001, 76, 196-202.
- Andreozzi R., D'Apuzzo A. and Marotta R.,** A kinetic model for the degradation of benzothiazole by Fe³⁺-photo-assisted Fenton process in a completely mixed batch reactor. *J. Hazard. Mat.*, 2000, 80, 241-257.
- Andrews E.J. and Novak P.J.,** Influence of ferrous iron and pH on carbon tetrachloride degradation by *Methanosarcina thermophila*. *Wat. Res.*, 2001, 35, 2307-2313.
- Andrianirinaharivelo S.L., Pilichowski J-F. and Bolte M.,** Nitrilotriacetic acid transformation photo-induced by complexation with iron(III) in aqueous solution. *Transition Met. Chem.*, 1993, 18, 37-41.
- Andrianirinaharivelo S.L.,** Thèse de l'Université Blaise Pascal, N° d'ordre D.U : 384, Clermont Ferrand (France), 1992.
- Azam F., Fuhr F. and Mittelstaedt W.,** Fate of [carbonyl-¹⁴C]methabenzthiazuron in an arid region soil. Effect of organic amendment, and soil disturbance and fumigation. *Plant soil*, 1988, 107, 149-158.
- Bajt O., Mailhot G. and Bolte M.,** Degradation of dibutyl phthalate by homogeneous photocatalysis with Fe(III) in aqueous solution. *Appl. Cat. B Environ.*, 2001, 33, 239-248.

- Balmer M.E. and Sulzberger B.,** Atrazine Degradation in Irradiated Iron/Oxalate Systems: Effects of pH and Oxalate. *Environ. Sci. Technol.*, 1999, 33, 2418-2424.
- Balzani V. and Carassiti V.,** Photochemistry of coordination compound. Academic Press, London, 1970.
- Barbeau K., Rue E.L., Bruland K.W. and Butler A.,** Photochemical cycling of iron in the surface ocean mediated by microbial iron(III)-binding ligands. *Nature*, 2001, 413, 409.
- Bartels I., Knackmuss H.J. and Reineke W.,** Suicide inactivation of catechol 2,3-dioxygenase from *Pseudomonas putida* mt-2 by 3-halocatechols. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1984, 47, 500-505.
- Bates H.G.C. and Uri N.,** Oxidation of Aromatic Compounds in Aqueous Solution by Free Radicals Produced by Photo-excited Electron Transfer in Iron Complexes. *J. Am. Chem. Soc.*, 1953, 75, 2754-2759.
- Baxendale J.H. and Magee J.,** The photochemical oxidation of benzene in aqueous solution by ferric ion. *Trans. Faraday Soc.*, 1955, 51, 205-213.
- Behra P. and Sigg L.,** Evidence for redox cycling of iron in atmospheric water droplets. *Nature*, 1990, 344, 419-421.
- Benkelberg H-J. and Warneck P.,** Photodecomposition of Iron(III) Hydroxo and Sulfato Complexes in Aqueous Solution: Wavelength Dependence of OH and SO₄⁻ Quantum Yields. *J. Phys. Chem.*, 1995, 99, 5214-5221.
- Benkelberg H-J., Schâfer A. and Warneck P.,** Air Pollution research Report 33: Atmospheric Oxidation Processes, ed. Becker, K. H., CEC, Brussel, 1991, 130.
- Berger B.M.,** Factors influencing transformation rates and formation of products of phenylurea herbicides in soil. *J. Agr. Food. Chem.*, 1999, 47, 3389-3396.
- Bertini I., Cremonini M. A., Ferreti S., Lozzi I., Luchinat C. and Viezzoli M.S.,** Arene Hydroxylases : metalloenzymes catalysing dioxygenation of aromatic compounds. *Coord. Chem. Rev.*, 1996, 151, 145-160.

- Besse P., Combourieu B., Boyse G., Sancelme M., De Wever H. and Delort A.M.,** Long range ^1H - ^{15}N heteronuclear shift correlation at natural abundance: a tool to study benzothiazole biodegradation by two *Rhodococcus* strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001, 67, 1412-1417.
- Bezkorovainy A., Miller-Catchpole R., Poch M. and Solberg L.,** The mechanism of ferrous iron binding by suspensions of *Bifidobacterium bifidum* var. pennsylvanicus. *Biochim. Biophys. Acta - General Subjects*, 1986, 884, 60-66.
- Binda C., Coda A., Aliverti A., Zanetti G. and Mattevi A.,** Structure of the mutant E92K of [2Fe-2S] ferredoxin I from *Spinacia oleracea* at 1.7 Å resolution. *Acta Crystallogr. Sect. D, Biological crystallography*, 1998, 54, 1353-1358.
- Brand N., Mailhot G., Sarakha M. and Bolte M.,** Primary mechanism in the degradation of 4-octylphenol photoinduced by Fe(III) in water-acetonitrile solution. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, 2000, 135, 221-228.
- Brand N.,** Thèse de l'Université Blaise Pascal, N° d'ordre D.U : 1063, Clermont Ferrand (France), 1998.
- Brownlee B.G., Carey J.H., Mac-Innis G.A. and Pellizzari I.T.,** Aquatic environmental chemistry of 2-(thiocyanomethylthio)benzothiazole and related benzothiazoles. *Environ. Toxicol. Chem.*, 1992, 11, 1153-1168.
- Bryson H., Fulton B. and Benfield P.,** Riluzole : a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic potential in amyotrophic lateral sclerosis. *Drugs*, 1996, 52, 549-563.
- Bucheli-Witsechel M. and Egli T.,** Environmental fate and microbial degradation of aminopolycarboxylic acids. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2001, 25, 69-106.
- Buerge I.J. and Hug S.L.,** Kinetics and pH Dependence of Chromium(VI) Reduction by Iron(II). *Environ. Sci. Technol.*, 1997, 31, 1426-1432.
- Bujdakova H., Kuchta T., Sidoova E. and Gvozdjakova A.,** Anti-*Candida* activity of four antifungal benzothiazoles. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1993, 112, 329-334.

- Candidus S., Van Pée K.-H., and Ligens F.,** The catechol 2,3-dioxygenase gene of *Rhodococcus rhodochrous* CTM : nucleotide sequence, comparison with isofunctional dioxygenases and evidences for an active-site histidine. *Microbiology*, 1994, 140, 321-330.
- Carey J.H. and Langford C.H.,** Photodecomposition of Fe(III) Aminopolycarboxylates. *Can. J. Chem.*, 1973, 51, 3665-3670.
- Carrano C.J., Jordan M., Drechsel H., Schmid D.G. and Winkelmann, G.,** Heterobactins: a new class of siderophores from *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 containing both hydroxamate and catecholate donor groups. *Biometals*, 2001, 14, 119-125.
- Catastini C., Sarakha M., Mailhot G. and Bolte M.,** Iron (III) aquacomplexes as effective photocatalysts for the degradation of pesticides in homogeneous aqueous solutions. *Sci. Total Environ.*, 2002, 298, 219-228.
- Cheng H., Fuhr F., Jarczik H.J. and Mittelstaedt W.,** Degradation of Methabenzthiazuron in the Soil. *J. Agr. Food Chem.*, 1978, 26, 595-599.
- Choi S.J., Park H.J., Lee S.K., Kim S.W., Han G. and Choo H.Y.,** Solid phase combinatorial synthesis of benzothiazoles and evaluation of topoisomerase II inhibitory activity. *Bioorg. Med. Chem.*, 2006, 14, 1229-1235.
- Conklin M.H. and Hoffmann M.R.,** Metal ion-sulfur(IV) chemistry. 3. Thermodynamics and kinetics of transient iron(III)-sulfur(IV) complexes. *Environ. Sci. Technol.*, 1988, 22, 899-907.
- Cunningham J.M., Goldberg M.C. and Weiner E.R.,** Mechanisms for aqueous photolysis of adsorbed benzoate, oxalate, and succinate on iron oxyhydroxide (goethite) surfaces. *Environ. Sci. Technol.*, 1988, 22, 1090-1097.
- De Vos D., De Wever H. and Verachtert H.,** Parameters affecting the degradation of benzothiazoles and benzimidazoles in activated sludge systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1993a, 39, 622-626.
- De Vos D., De Wever H. and Verachtert H.,** Isolation and characteristics of 2-hydroxybenzothiazole-degrading bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1993b, 39, 377-381.

- De Wever H., De Moor K. and Verachtert H.,** Toxicity of 2-mercaptobenzothiazole towards bacterial growth and respiration. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1994a, 42, 631-635.
- De Wever H. and Verachtert H.,** 2-mercaptobenzothiazole degradation in laboratory fed-batch systems. *Appl. Microb. Biotechnol.*, 1994b, 42, 623-630.
- De Wever H.,** Biodegradability of benzothiazoles. PhD Thesis, Université de Louvain. (Belgique) 1995.
- De Wever H., Van Den Neste S. and Verachtert H.,** Inhibitory effects of 2-Mercaptobenzothiazole on microbial growth in a variety of trophic conditions. *Environ. Toxicol. Chem.*, 1997a, 16, 843-848.
- De Wever H., De Cort S., Noots I. and Verachtert H.,** Isolation and characterization of *Rhodococcus rhodochrous* for the degradation of the wastewater component 2-hydroxybenzothiazole. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1997b, 47, 458-461.
- De Wever H., Vereecken K., Stolz A. and Verachtert H.,** Initial transformations in the biodegradation of benzothiazoles by *Rhodococcus* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1998, 64, 3270-3274.
- De Wever H., Besse P. and Verachtert H.,** Microbial transformations of 2-substituted benzothiazoles. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2001, 57, 620-625.
- Delort A.M. and Combourieu B.,** *In situ* ¹H-NMR study of the biodegradation of xenobiotics: application to heterocyclic compounds. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 2001, 26, 2-8.
- Deng N., Wu F., Luo F. and Xiao M.,** Ferric citrate-induced photodegradation of dyes in aqueous solutions. *Chemosphere*, 1998, 36, 3101-3112.
- Dessai A.G. and Milburn R.M.,** Iron(III)-phenol complexes. IV. Further thermodynamic studies of iron(III)-phenolate and proton-phenolate associations *J. Amer. Chem. Soc.*, 1969, 91, 1958-1961.

- Diez M.C., Pouleurs D., Navia R. and Vidal G.** Effect of EDTA and FeEDTA complex concentration on TCF Kraft mill effluent degradability. Batch and continuous treatments. *Wat. Res.*, 2005, 39, 3239-3246.
- Dinkla I.J.T., Gabor E.M. and Janssen D.B.,** Effects of iron limitation on degradation of toluene by *Pseudomonas* strains carrying the TOL (pWWO) plasmid. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001, 67, 3406-3412.
- Dorn E. and Knackmuss H.J.,** Chemical structure and biodegradability of halogenated aromatic compounds. Substituent effects on 1,2-dioxygenation of catechol. *J. Biochem.*, 1978, 174, 85-94.
- Drotar A.M., Burton G.A., Tavernier J.E. and Fall R.,** Widespread occurrence of bacterial thiol methyltransferases and the biogenic emission of methylated sulfur gases. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1987, 53, 1626-1631.
- Dubey R., Shrivastava P.K., Basniwal P.K., Bhattacharya S. and Moorthy N.S.,** 2-(4-aminophenyl)benzothiazole: a potent and selective pharmacophore with novel mechanistic action towards various tumour cell lines. *Mini Rev. Med. Chem.*, 2006, 6, 633-637.
- Earhart C.A., Vetting M.W., Gosu R., Michaud-Soret I., Que L. and Ohlendorf D.H.,** Structure of catechol 1,2-dioxygenase from *Pseudomonas arvilla*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005, 338, 198-205.
- Eberle S.H. and Palmer W.Z.,** Über die Partikelgrößenverteilung und die Löslichkeit des Eisens(III) im Rheinwasser. *Z. Wasser Abwasser Forsch.*, 1986, 19, 213-218.
- Egli T.,** Biodegradation of metal-complexing aminopolycarboxylic acids. *J. Biosc. Bioeng.*, 2001, 92, 89-97.
- Eltis L.D. and Bolin J.T.,** Evolutionary relationships among extradiol dioxygenases. *J. Bacteriol.*, 1996, 178, 5930-5937.
- Emmenegger L., Schonenberger R., Sigg L. and Sulzberger B.,** Light-induced redox cycling of iron in circumneutral lakes. *Limnol. Oceanogr.*, 2001, 46, 49-61.

Escot M.T., Thèse de doctorat en Pharmacie, Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand (France), 1973.

Evans M.G. and Uri N., Nature, 1949, 164, 404.

Ito K., Jian W., Nishijima W., Baes A.U., Shoto E. and Okada M., Comparison of ozonation and AOPs combined with biodegradation for removal of THM precursors in treated sewage effluents. Water Sci. Technol., 1998, 37, 179-186.

Faust B.C. and Zepp R.G., Photochemistry of aqueous iron(III)-polycarboxylate complexes: roles in the chemistry of atmospheric and surface waters. Environ. Sci. Technol., 1993, 27, 2517-2522.

Faust B.C. and Hoigné J., Photolysis of Fe(III)-hydroxy complexes as sources of OH[•] radicals in clouds, fogs and rain. Atmos. Environ., 1990, 24A, 79-89.

Ferraroni M., Solyanikova I.P., Kolomytseva M.P., Scozzafava A., Golovleva L. and Briganti, F., Crystal structure of 4-chlorocatechol 1,2-dioxygenase from the chlorophenol-utilizing gram-positive *Rhodococcus opacus* 1CP. J. Biol. Chem., 2004, 279, 27646-27655.

Ferraroni M., Seifert J., Travkin V.M., Thiel M., Kaschabek S., Scozzafava A., Golovleva L., Schlomann M. and Briganti F., Crystal structure of the hydroxyquinol 1,2-dioxygenase from *Nocardioides simplex* 3E, a key enzyme involved in polychlorinated aromatics biodegradation. J. Biol. Chem., 2005, 280, 21144-21154.

Fiehn O., Reetsma T. and Jekel M., Extraction and analysis of various benzothiazoles from industrial wastewater. Anal. Chim. Acta., 1994, 295, 297-305.

Fiehn O., Wegener G., Jochimsen J. and Jekel M., Analysis of the ozonation of 2-mercaptobenzothiazole in water and tannery wastewater using sum parameters, liquid- and gas chromatography and capillary electrophoresis. Wat. Res., 1998, 32, 1075-1084.

Fiss E. and Brooks G.F., Use of a siderophore detection medium, ethylene glycol degradation, and beta-galactosidase activity in the early presumptive differentiation of *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*, and rapidly growing *Mycobacterium* species. J. Clin. Microbiol., 1991, 29, 1533-1535.

- Flynn C.M.Jr.**, Hydrolysis of inorganic iron(III) salts. *Chem. Rev.*, 1984, 84, 31-41.
- Furusawa Y., Nagarajan V., Tanokura M., Masai E., Fukuda M., Senda T.**, Crystal Structure of the Terminal Oxygenase Component of Biphenyl Dioxygenase Derived from *Rhodococcus* sp. Strain RHA1. *J. Mol. Biol.*, 2004, 342, 1041-1052.
- Gaja M.A. and Knapp J.S.**, Removal of 2-mercaptobenzothiazole by activated sludge : a cautionary note. *Wat. Res.*, 1998, 32, 3786-3789.
- Gaja M.A. and Knapp J.S.**, The microbial degradation of benzothiazoles. *J. Appl. Microbiol.*, 1997, 83, 327-334.
- Goettfert J., Parlar H. and Korte F.**, Microbial transformation of [^{14}C]methabenzthiazuron by the soil fungus *Hypocrea* Cf. *pilulifera* St. Con : isolation, identification and characterization of some metabolites from the chloroform extract. *J. Agric. Food Chem.*, 1978, 26, 628-632.
- Gold L.S., Slone T.H., Stern B.R. and Bernstein L.**, Comparison of target organs of carcinogenicity for mutagenic and non-mutagenic chemicals. *Mutat. Res.*, 1993, 286, 75-100.
- Goldberg M.C., Cunningham K.M. and Weiner E.R.J.**, Aquatic photolysis: photolytic redox reactions between goethite and adsorbed organic acids in aqueous solutions. *Photochem. Photobiol., A : Chem.*, 1993, 73, 105-120.
- Grivet J.P., Delort A.M. and Portais J.C.**, NMR and microbiology : from physiology to metabolomics. *Biochimie*, 2003, 85, 823-840.
- Gustavson R.L. and Martell A.E.**, Hydrolytic tendencies of ferric chelates. *J. Phys. Chem.*, 1963, 67, 576-582.
- Harayama S. and Rekik M.**, Bacterial aromatic ring-cleavage enzymes are classified in two different gene families. *J. Biol. Chem.* 1989, 264,15328-15333.
- Haroune N., Combourieu B., Besse P., Sancelme M. and Delort A. M.**, ^1H NMR : a tool to study the fate of pollutants in the environment. *C. R. A. S. Paris / chemistry n° spécial GERM RMN* 2001, 4, 759-763.

- Haroune N., Combourieu B., Besse P., Sancelme M., Reemtsma T., Kloefer A., Diab A., Knapp J. S., Baumberg S. and Delort A. M.,** Benzothiazole degradation by *Rhodococcus pyridinovorans* strain PA : evidence of a catechol 1,2-dioxygenase activity. Appl. Environ. Microbiol., 2002, 68, 6114-6120.
- Haroune N.,** Thèse de l'Université Blaise Pascal, N° d'ordre D.U : 1458, Clermont-Ferrand (France), 2003.
- Hemmes P., Rich L.D., Cole D.L. and Eyring E.M.,** Kinetics of hydrolysis of ferric ion in dilute aqueous solution. J. Phys. Chem., 1971, 75, 929-932.
- Hout S., Azas N., Darque A., Robin M., Di Giorgio C., Gasquet M., Galy J. and Timon-David P.,** Activity of benzothiazoles and chemical derivatives on *Plasmodium falciparum*. Parasitology, 2004, 129, 525-535.
- Janin C.,** Chimie et pneumatiques. L'actualité chimique. Numéro spécial "Chimie et vie quotidienne", 1999, 11, 67-71.
- Karadakov B.P. and Venkova D.I.,** The complexes of bismuth(III) and nitrilotriacetic acid. Talanta, 1970, 17, 878-883.
- Karelova E. and Tomasovicova D.,** Anaerobic degradation of 2-mercaptobenzothiazole by sulfur bacteria. Biologia-Bratisl., 1988, 43, 617-622.
- Kari G.F., Hilger S. and Canonica S.,** Determination of the Reaction Quantum Yield for the Photochemical Degradation of Fe(III)-EDTA: Implications for the Environmental Fate of EDTA in Surface Waters. Environ. Sci. Technol., 1995, 29, 1008-1017.
- Kawaguchi H. and Inagaki A.,** Photochemical generation rates of hydroxyl radical in aqueous solutions containing Fe(III)-hydroxy complex. Chemosphere, 1993, 27, 2381-2387.
- Kawaguchi, H. and Inagaki A.,** Kinetics of ferric ion promoted photodecomposition of 2-chlorophenol. Chemosphere, 1994, 28, 57-62.
- Kleckla G. and Gonsior S.J.,** Reductive dechlorination of chlorinated methanes and ethanes by reduced iron (II) porphyrins. Chemosphere, 1984, 13, 391-402.

- Kloepfer A., Gnirss R., Jekel M. and Reemtsma T.,** Occurrence of benzothiazoles in municipal wastewater and their fate in biological treatment. *Wat. Sci. Technol.*, 2004, 50, 203-208.
- Kloepfer A., Jekel M. and Reemtsma T.,** Occurrence, sources, and fate of benzothiazoles in municipal wastewater treatment plants. *Environ. Sci. Technol.*, 2005, 39, 3792-3798.
- Knight R.J. and Sylva R.N.,** Spectrophotometric investigation of iron(III) hydrolysis in light and heavy water at 25°C. *J. Inorg. Nucl. Chem.*, 1975, 37, 779-783.
- Kot-Wasik A., Damrowska D. and Namiesnik J.,** Photodegradation and biodegradation study of benzo(a)pyrene in different liquid media. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, 2004, 168, 109-115.
- Koymans L., Donné-Op Den Kelder G.M., Te Koppele J.M. and Vermeulen N.P.E.,** Cytochrome P450: their active-site structure and mechanism of oxidation. *Drug Metab. Rev.*, 1993, 25, 325-387.
- Langford C.H. and Carey J.H.,** The Charge Transfer Photochemistry of the Hexaquoiron(III) Ion, the Chloropentaaquoiron(III) Ion, and the μ -Dihydroxo Dimer Explored with *tert*-Butyl Alcohol Scavenging. *Can. J. Chem.*, 1975, 53, 2430-2435.
- Lati J. and Meyerstein D.,** Oxidation of first-row bivalent transition-metal complexes containing ethylenediaminetetra-acetate and nitrilotriacetate ligands by free radicals: a pulse-radiolysis study. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 1978, 9, 1105-1118.
- Lau P.T.S. and Gompf T.E.,** Reaction of Quinones with Thiourea. A novel Route to 2-amino-6-hydroxybenzothiazoles and 2-amino-5-hydroxynaphto[1,2-d]thiazoles. *J. Org. Chem.*, 1970, 35, 12, 4103-4108.
- Mailhot G., Bordes A.L. and Bolte M.,** Iminodiacetic acid degradation photoinduced by complexation with monometallic (iron (III)) and bimetallic systems (iron (III) and copper (II)). *Chemosphere*, 1995, 30, 1729-1937.
- Mainprize J., Knapp J.S and Cally A.G.,** The fate of benzothiazole-2-sulphonic acid in biologically treated industrial effluents. *J. Appl. Bact.*, 1976, 40, 285-291.

- Malouki M., Giry G., Besse P., Combourieu B., Sancelme M., Bonnemoy F., Richard C. and Delort A.M.,** Sequential bio- and phototransformation of the herbicide methabenzthiazuron in water. *Environ. Toxicol. Chem.*, 2003, 22, 2013-2019.
- Malouki M.,** Photo et/ou biotransformation de l'ioxynil et des dérivés benzothiazoliques. Thèse de l'Université Menouri de Constantine, N° d'ordre D.U :, (République Algérienne Démocratique et Populaire), 2004.
- Malouki M.A., Lavédrine B. and Richard C.,** Phototransformation of methabenzthiazuron in the presence of nitrate and nitrite ions. *Chemosphere*, 2005, 60, 1523-1529.
- Martin J.H., Gordon R.M. and Fitzwater S.E.,** Iron in Antarctic waters. *Nature*, 1990, 345, 156-158.
- Matsui T., Tanaka Y. and Marubashi K.,** Benzothiazole-degrading *Pseudomonas* for bioremediation. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho*. 2004, 12 pp.
- Matthijs E., De Oude N.T., Bolte M. and Lemaire J.,** Photodegradation of ferric ethylenediaminetetra(methylenephosphonic acid) (EDTMP) in aqueous solution. *Wat. Res.*, 1989, 23, 845-851.
- Mazellier P., Mailhot G. and Bolte M.,** Photochemical behaviour of the Iron(III)/2,6-dimethylphenol system. *New J. Chem.*, 1997a, 21, 389-397.
- Mazellier P., Jirkovsky, P. and Bolte M.,** Photodegradation of diuron induced by iron(III) in aqueous solution. *Pestic. Sci.*, 1997b, 49, 259-267.
- Mazellier P., Sarakaha M. and Bolte M.,** Primary mechanism for the iron(III) photoinduced degradation of 4-chlorophenol in aqueous solution. *New J. Chem.*, 1999, 23, 133-137.
- Mazellier P. and Bolte M.,** 3-Chlorophenol elimination upon excitation of dilute iron(III) solution: evidence for the only involvement of $\text{Fe}(\text{OH})^{2+}$. *Chemosphere*, 2001, 42, 361-366.
- Meijer W.G. and Prescott J.F.,** *Rhodococcus equi*. *Vet. Res.*, 2004, 35, 383-396.

- Mestankova H., Mailhot G., Krysa J., Jirkovsky P. and Bolte M.,** Homogeneous (Fe(III)) and heterogeneous (TiO₂) photocatalytic systems for pollutant removal from the aquatic compartment : comparison and complementarity. *Wat. Sci. Technol.*, 2004, 49, 165-170.
- Metsärinne S., Rantanen P., Aksela R. and Tuhkanen T.,** Biological and photochemical degradation rates of diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA) in the presence and absence of Fe(III). *Chemosphere*, 2004, 55, 379-388.
- Milburn R.M.,** A Spectrophotometric Study of the Hydrolysis of Iron(III) Ion. III. Heats and Entropies of Hydrolysis. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1956, 79, 537-540.
- Murray K.S.,** Binuclear oxo-bridged iron(III) complexes. *Coord. Chem. Rev.*, 1974, 12, 1-35.
- Nakai C., Horiike K., Kuramitsu S., Kagamiyama H. and Nozaki M.,** Three isozymes of catechol 1,2-dioxygenase (Pyrocatechase), $\alpha\alpha$, $\alpha\beta$ and $\beta\beta$, from *Pseudomonas arvilla* C-1*. *J. Biol. Chem.*, 1990, 265, 660-665.
- Nancharaiah Y.V., Schwarzenbeck N., Mohan T.V.K., Narasimhan S.V., Wilderer P.A. and Venugopalan V.P.,** Biodegradation of nitrilotriacetic acid (NTA) and ferric-NTA complex by aerobic microbial granules. *Wat. Res.*, 2006, 40, 1539-1546.
- Natarajan P. and Endicott J.F.,** Photoredox behavior of transition metal-ethylenediaminetetraacetate complexes. A comparison of some group VIII metals. *J. Phys. Chem.*, 1973, 77, 2049-2054.
- Neveux N., Aubertin N., Gerardin R. and Evrard O.,** Stabilized Ferrates (VI): Synthesis methods and applications. In: Klute, R., Hahn, H. H., (Eds), *Chemical Water and Wastewater Treatment III*, 95–103, Springer-Verlag, Berlin, 1994.
- Nozaki M.,** Oxygenase and dioxygenase. *Top. Curr. Chem.*, 1979, 78, 145-186.
- Nuttal R.H. and Stalkir D.M.,** Structure and bonding in the metal complexes of ethylenediaminetetra-acetic acid. *Talanta*, 1977, 24, 355-360.
- Ogino H., Nagata T. and Ogino K.,** Redox potentials and related thermodynamic parameters of (diaminopolycarboxylato)metal(III/II) redox couples. *Inorg. Chem.*, 1989, 28, 3656-3659.

- Párkányi C. and Abdelhamid A.O.**, Photodegradation of pesticide : photolysis of 2-mercaptobenzothiazole. *Heterocycle*, 1985, 23, 2917-2926.
- Pehkonen S.O., Erel Y. and Hoffmann M.R.**, Simultaneous spectrophotometric measurement of iron(II) and iron(III) in atmospheric water. *Environ. Sci. Technol.*, 1992, 26, 1731-1736.
- Pelmont J.**, Bactéries et environnement, adaptations physiologiques. Presses universitaires de Grenoble, 1993.
- Pierre J.L., Fontecave M. and Crichton R.R.**, Chemistry for an essential biological process: the reduction of ferric iron. *Biometals*, 2002,15, 341-346.
- Pignatello J.J.**, Dark and photoassisted iron(3+)-catalyzed degradation of chlorophenoxy herbicides by hydrogen peroxide. *Environ. Sci. Technol.*, 1992, 26, 944-951.
- Poulain L., Mailhot G., Wong-Wah P. and Bolte M.**, Photodegradation of chlortoluron sensitised by iron(III) aquacomplexes. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, 2003, 159, 81-88.
- Poulos T.L., Finzel B.C. and Howard A.J.**, High-resolution crystal structure of cytochrome P450_{cam}. *J. Mol. Biol.*, 1987, 195, 687-700.
- Price N.M. and Morel F.M.M.**, Biological cycling of iron in the ocean, In Sigel, A., Sigel, H., (Eds) *Metal Ions in Biological Systems*, Marcel Dekker, Inc., New York, 1998, 35, 1-36.
- Printz H., Buraue P. and Führ F.**, Effect of organic amendment on degradation and formation of bound residues of methabenzthiazuron in soil under constant climatic conditions. *J. Environ. Sci. Health*, 1995, B30, 435-456.
- Rada B., Holbova E., Mikulasek S., Sidova E. and Gvozdjakova A.**, Antiviral activity of benzothiazole and benzothiazolinethione derivatives in cell cultures. *Acta Virol.*, 1979, 23, 203-209.
- Reemstma T.**, Determination of 2-substituted benzothiazoles of industrial use from water by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2000,14, 1612-1618.

- Reemtsma T., Fiehn O., Kalnowski G. and Jekel M.,** Microbial transformations and biological effects of fungicide-derived benzothiazoles determined in industrial wastewater. *Environ. Sci. Technol.*, 1995, 29, 478-485.
- Regula S., Ondris L. and Kacani S.,** Physicochemical pretreatment of wastewaters from the production of benzothiazole derivatives. *Czech. CS 208*, 626 December 1st (in Czech). Cited in *Chem. Abstr. CA 101* : 136470q.
- Repkina V.I., Dokudovskaya S.A., Umrikhina R.A. and Samokhina V.A.,** Maximum permissible concentrations of benzothiazole and 2-mercaptobenzothiazole during biochemical treatment of wastewaters. *Khim. Prom-st.*, 1983, 10, 598-599.
- Roberts G.A., Grogan G., Greter A., Flitsch S.L. and Turner N.J.,** Identification of a new class of cytochrome P450 from a *Rhodococcus* sp. *J. Bacteriol.*, 2002, 184, 3898-3908.
- Rose A.L. and Waite T.D.,** Kinetic Model for Fe(II) Oxidation in Seawater in the Absence and Presence of Natural Organic Matter. *Environ. Sci. Technol.*, 2002, 36, 433-444.
- Sakriß W., Gäb S. und Korte F.,** Photooxidationsreaktionen von methabenzthiazuron in Lösung. *Chemosphere*, 1976, 5, 339-348.
- Sarasa J., Llabrés T., Ormad P., Mosteo R. and Ovelleiro J.L.,** Characterization and photo-Fenton treatment of used tires leachate. *J. Hazard. Mater.*, 2006, 136, 874-881.
- Schach S., Tshisuaka B., Fetzner S. and Ligen F.,** Quinoline 2-oxidoreductase and 2-oxo-1,2-dihydroquinoline 5,6-dioxygenase from *Comamonas testosteroni* 63. The first two enzymes in quinoline and 3-methylquinoline degradation. *Eur. J. Biochem.*, 1995, 232, 536-544.
- Schlichting I., Jung C. and Schulze H.,** Crystal structure of cytochrome P-450_{cam} complexed with the enantiomer. *FEBS Lett.*, 1997, 415, 253-257.
- Sedlak D. L. and Hoigné J.,** The role of copper and oxalate in the redox cycling of iron in atmospheric waters. *Atmos. Environ.*, 1993, 27A, 2173-2185.
- Siefert R.L., Webb S.M., Hoffmann M.R.,** Determination of photochemically available iron in ambient aerosols. *J. Geophys. Res.*, 1996, 101, 14441-14450.

- Sommer B.A. and Margerum D.W.**, Kinetic study of the hydroxoiron(III) dimer. *Inorg. Chem.*, 1970, 9, 2517-2521.
- Stafford U., Gray K.A. and Kamat P.V.**, Radiolytic and TiO₂-Assisted Photocatalytic Degradation of 4-Chlorophenol. A Comparative Study. *J. Phys. Chem.*, 1994, 98, 6343-6351.
- Stone S.T. and Hug S.J.**, Reduction and dissolution of manganese(III) and manganese(IV) oxides by organics. 1. Reaction with hydroquinone. *Environ. Sci. Technol.*, 1984a, 18, 450-456.
- Stone S.T. and Hug S.J.**, Reduction and dissolution of manganese(III) and manganese(IV) oxides by organics: 2. Survey of the reactivity of organics. *Environ. Sci. Technol.*, 1984b, 18, 617-624.
- Stookey L.L.**, Ferrozine: a new spectrophotometric reagent for iron. *Anal. Chem.*, 1970, 42, 779-781.
- Stratchan P.D., Freer A.A. and Fewson C.A.**, Purification and characterization of catechol 1,2-dioxygenase from *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 13259 and cloning and sequencing its *catA* gene. *Biochem. J.*, 1998, 333, 741-747.
- Sugiyama K., Senda T., Narita H., Yamamoto T., Kimbara K., Fukuda M. and Yano K., Mitsui Y.**, Three-Dimensional Structure of 2,3-Dihydroxybiphenyl Dioxygenase (Bphc Enzyme) from *Pseudomonas* sp. Strain Kks102 Having Polychlorinated Biphenyl (Pcb)-Degrading Activity. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B*, 1995, 71, 32.
- Ternan N.G. and McMullan G.**, Iminodiacetate and nitrilotriacetate degradation by *Kluyveromyces marxianus* IMB3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2002, 290, 802-805.
- Titus G.P., Mueller H.A., Burgner J., Rodriguez De Cordoba S., Penava M.A. and Timm D.E.**, Crystal structure of human homogentisate dioxygenase. *Nat. Struct. Biol.*, 2000, 7, 542-546.
- Uragami Y., Senda T., Sugimoto K., Sato N., Nagarajan V., Masai E., Fukuda M. and Mitsu Y.**, Crystal structures of substrate free and complex forms of reactivated BphC, an extradiol type ring-cleavage dioxygenase. *J. Inorg. Biochem.*, 2001, 83, 269-279.

- Valdés H. and Zaror C.A.**, Advanced treatment of benzothiazole contaminated waters: comparison of O₃, AC, and O₃/AC processes. *Wat. Sci. Technol.*, 2005, 52, 281–288.
- Vel'tman R.P. and Yanovskii F.G.**, Hydroxy derivatives of 2-aminobenzothiazole. *Ukrains'kii Khimichnii Zhurnal.*, 1955, 21, 347-349.
- Vetting M.W. and Ohlendorf D.H.**, The 1.8 Å crystal structure of catechol 1,2-dioxygenase reveals a novel hydrophobic helical zipper as a subunit linker. *Structure Fold. Des.*, 2000, 8, 429-440.
- Wackett P.W., Kwart L.D. and Gibson D.T.**, Benzenic monooxygenation catalysed by toluene dioxygenase from *Pseudomonas putida*. *Biochemistry*, 1988, 27, 1360-1367.
- Waite T.D. and Morel F.M.M.**, Photoreductive dissolution of colloidal iron oxide: effect of citrate. *J. Colloid Interface Sci.*, 1984, 102, 121-137.
- Waite T.D., Szymczak R., Epsey Q.I. and Furnas M.J.**, Iron speciation in northern Australian shelf waters. *Mar. Chem.*, 1995, 50, 79-91.
- Wallnöfer P., Tillmanns G., Thomas R., Wünsche C., Kurz J. and Jarczyk H.J.**, Mikrobieller Abbau des Herbizids Methabenzthiazuron und Identifizierung der Metaboliten. *Chemosphere*, 1976, 5, 377-382.
- Wang G-S., Chen H-W. and Kang S-F.**, Catalysed UV oxidation of organic pollutants in biologically treated waster effluent. *Sci. Total environ.*, 2001, 277, 87-94.
- Weiss J.**, Elektronenübergangsprozesse im Mechanismus von Oxydations- und Reduktionsreaktionen in Lösungen. *J. Naturwissenschaften*, 1935, 23, 64-69.
- Weschler C.J., Mandich M.L. and Graedel T.E.**, Speciation, photosensitivity and reactions of transition metal ions in atmospheric droplets. *J. Geophys. Res. D: Atmos.*, 1986, 91, 5189-5204.
- Whittaker M.H., Gebhart A.M., Miller T.C. and Hammer F.**, Human health risk assessment of 2-mercaptobenzothiazole in drinking water. *Toxicol. Ind. Health.*, 2004, 20, 149-163.

Zepp R.G., Faust B.C. and Hoigné J., Hydroxyl radical formation in aqueous reactions (pH 3-8) of iron(II) with hydrogen peroxide: the photo-Fenton reaction. Environ. Sci. Technol., 1992, 26, 313-319.

Ziegler D.M., Recent studies on the structure and function of multisubstrate flavin-containing monooxygenases. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., 1993, 33, 179-199.

Sites Internet :

www.rcsb.org

www.epa.gov